

Systematische funktionelle Analyse
der Wsc- und Mid-Sensorfamilie
in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Anne Pia Lutz
aus Pforzheim

Marburg,
September 2019

Diese Arbeit wurde von Mai 2015 bis September 2019 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Molekulare Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation angenommen am:

05.11.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: PD Dr. Christof Taxis

Tag der mündlichen Prüfung:

10.12.2019

In diesem Zeitraum angefertigte Publikation (nicht Teil dieser Arbeit):

Lutz, A. P., Schladebeck, S., Renicke, C., Spadaccini, R., Mösch, H.-U. & Taxis, C. (2018).
Proteasome Activity Is Influenced by the HECT_2 Protein Ipa1 in Budding Yeast. Genetics 209, 157–171.

Zusammenfassung

Wie alle Lebewesen muss sich der Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* an eine stetig verändernde Umwelt anpassen. Dafür benötigt der Pilz Sensorsysteme, die verschiedene äußere Einflüsse erkennen, sodass er mit einer adäquaten Zellantwort reagieren kann. Umweltbedingungen, die Einfluss auf die Zellwand von *S. cerevisiae* nehmen, werden von den Sensoren und Proteinen des konservierten Zellwandintegritäts-Signalweg („Cell Wall Integrity-Pathway“, CWI) erkannt und weiterverarbeitet. Zu diesen Zellwand-beeinträchtigenden Bedingungen können unter anderem sowohl chemische, als auch mechanische Stresse gehören. Die CWI-Sensoren aus *S. cerevisiae* können in die Wsc- und Mid-Familie aufgeteilt werden. Zu den Wsc-Sensoren werden die Proteine Wsc1, Wsc2 und Wsc3 gezählt, die sich durch eine für die Funktion essentielle Kopfgruppe, der Wsc- oder Cystein-reichen Domäne (CRD) auszeichnen. Diese ist in der zweiten Gruppe der CWI-Sensoren, den Mid-Proteinen Mid2 und Mtl1, nicht vorhanden.

In dieser Arbeit sollte zum einen untersucht werden, ob sich eine spezifische Funktion der fünf Sensoren im Σ 1278b-Stammhintergrund von *S. cerevisiae* feststellen lässt. Dafür wurden Mutanten konstruiert, die nur noch einen oder keinen aktiven CWI-Sensor trugen. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, dass Zellen dieses Stammhintergrunds unter Normalbedingungen auch ohne die fünf Proteine überleben konnten. Zudem wurde festgestellt, dass Wsc1 nicht für die Resistenz gegen Koffein und Caspofungin benötigt wird, aber Zellen, die Kongorot-Stress ausgesetzt wurden, nur überleben konnten, wenn Wsc1 vorhanden war. Im Gegensatz dazu wird die CWI-Kinase Sit2 in Σ 1278b nicht zur Signalweiterleitung bei diesem Stress verwendet. Außerdem konnte eine Funktion von Wsc1 bei Biofilmbildung auf halbfestem Medium bestätigt werden, welche jedoch Nährstoff-abhängig zu sein scheint. Für Wsc2 wurde eine unterstützende Rolle der Überlebensrate der Hefezellen bei verschiedenen Zellwandstressen erkannt. Für die anderen Sensoren konnte keine spezifische Funktion gezeigt werden, jedoch wurde eine gegenseitige Einflussnahme der Sensoren vermutet und eine Funktion aller Sensoren bei der Adhäsion, dem Pseudhyphenwachstum, DNA-, reduktivem oder Aminosäurestress ausgeschlossen. Zudem wurden in verschiedenen Stammhintergründen von *S. cerevisiae* Unterschiede in der Sensortätigkeit und Signalweiterleitung des CWI aufgezeigt.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte aufgeklärt werden, ob gruppierte aromatische Aminosäuren, die an der Oberfläche der CRD-Kristallstruktur von Wsc1 liegen, essentiell für die Funktion des Sensors sind. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten aromatischen Aminosäuren wichtig für die Resistenz der Zellen gegen die chemischen Zellwandstresse Kongorot und Caspofungin sind. Zudem sorgen Austausche dieser Aminosäuren, ähnlich wie bei Mutationen in den konservierten Cystein-Resten der Domäne, für eine verstärkte Verlagerung der Sensoren ins Zellinnere.

Summary

As all living organisms, the microorganism *Saccharomyces cerevisiae* has to adapt to a constantly changing environment. For this purpose, the fungus needs sensing systems, which help to recognize the outer impacts and to properly react to them. Cell wall disturbing environmental conditions are recognized and processed by the yeast sensors and proteins of the conserved Cell-Wall-Integrity pathway (CWI). These conditions are for example mechanical or chemical stresses, which are sensed by the CWI-proteins of the Wsc- and Mid-family. The Wsc protein group consists of the sensors Wsc1, Wsc2 and Wsc3, which are characterized by the essential head group, called Wsc- or cysteine-rich domain (CRD). In the second group, the Mid-proteins with Mid2 and Mtl1, this CRD is not found.

One aim of this work was to clarify, if the five CWI-sensors had specific functions in cells of the yeast strain Σ 1278b. In favour of that, mutant strains with only one or no active sensor were constructed. It was shown, that cells without any sensor were able to grow without osmotic support. In addition to that, Σ 1278b Wsc1 was identified to be unnecessary for providing resistance to Caspofungin and caffeine, but important for sensing the cell wall stressor Congo Red. In contrast, the important CWI-kinase Slt2 was not needed for signal transduction in presence of this chemical stress compound. On top of that, a Wsc1 function in biofilm formation on semi-solid surfaces was confirmed, though this function seemed to be nutrient dependent. Wsc2 showed a supporting role in survival rate of the stress exposed yeast cells. None of the other sensors revealed any specific function, however a mutual influence of all sensors was indicated and a sensor function in adhesion, pseudohyphal growth, DNA-, reductive or amino acid-stress was excluded. Moreover, this work uncovered differences in sensing and signal transduction of the CWI in different strain backgrounds of *S. cerevisiae*.

Furthermore, it should be analysed, if clustered aromatic residues, which are exposed on the surface of the Wsc1 CRD-structure, were needed for sensor function. It was shown, that the investigated amino acid clusters were essential for the resistance of yeast cells exposed to the chemical cell wall stresses Congo Red or Caspofungin. On top of that, the exchanged amino acids led to a localization shift of the sensors into the cytoplasm, which was previously shown for Wsc1-sensors with mutations in the conserved cysteine residues in a similar way.

Abkürzungen

Die verwendeten Maßeinheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem (SI; „Système internationale d’unités“) und davon abgeleiteten Einheiten. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ verwendet.

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol	GFP	grün fluoreszierendes Protein
Amp	Ampicillin	Glk	Glukose
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GPI	Glycosylphosphatidylinositol
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	GTP	Guanosintriphosphat
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
BSA	Bovines Serumalbumin	His	Histidin
bzw.	beziehungsweise	HYG	Hygromycin B
ca.	circa	kb	Kilobase
CEN	„centromere“	LB	„Lysogeny Broth“
C-terminal	Carboxy-terminal	Leu	Leucin
CWI	„Cell wall integrity pathway“	LFM	„Low Fluorescence Medium“
(d)dH ₂ O	(zweifach) destilliertes Wasser	M	Molar
DL	Durchlicht	MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
DNA	„Deoxyribonucleic acid“	<i>MAT</i>	„Mating type“
dNTP	2'-Desoxy-Nucleoside-5'-triphosphate	min	Minute(n)
DTT	Dithiothreitol	MMS	Methyl-Methansulfonat
ECL	erhöhte Chemolumineszenz	mRNA	„Messenger Ribonucleic acid“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NAT	Nourseothricin (clonNAT)
<i>et al.</i>	und andere	NG	mNeongreen
EtOH	Ethanol	N-terminal	Amino-terminal
G ₄₁₈	Geneticin	OD	optische Dichte
Gal	Galaktose	PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
GDP	Guanosindiphosphat	PBS	„Phosphate Buffered Saline“
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“	PCR	„Polymerase chain reaction“
		PEG	Polyethylenglykol

pH	„Potentia hydrogenii“
PIR	„Proteins with internal repeats“
Rpm	„revolutions per minute“
SC	„Synthetic complete“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulphate“
SLAD	„Synthetic Low Ammonia Dextrose“
SORB	Sorbitol
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine
Tris	Tris-Aminomethan
Trp	Tryptophan
Tub	Tubulin
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
Wsc	„cell Wall integrity and Stress response Component“
WT	Wildtyp
Y2H	„Yeast-Two Hybrid“
YP	„Yeast extract peptone“
YPD	„Yeast extract peptone dextrose“
z.B.	Zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen.....	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Pilzliche Oberflächenwahrnehmung und Mechanosensoren	1
1.2 Der Modellorganismus <i>S. cerevisiae</i>	3
1.3 Die Zellwand von <i>S. cerevisiae</i>	5
1.4 Der Zellwandintegritäts-Signalweg in <i>S. cerevisiae</i>	7
1.5 Die Sensoren des Zellwandintegritäts-Signalwegs	10
1.5.1 Allgemeiner Aufbau und Struktur der Sensoren	10
1.5.2 Funktionelle Untersuchungen der Sensoren.....	14
1.6 Zielsetzung.....	16
2 Ergebnisse	17
2.1 Systematische funktionelle Analyse der Wsc-/Mid-Sensorfamilie	17
2.1.1 Herstellung von Hefestämmen zur Analyse der Funktion, Expression, Lokalisation und Stabilität einzelner Sensoren	17
2.1.2 Untersuchung der Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges	25
2.1.3 Untersuchung der Zellwandzusammensetzung	26
2.1.4 Funktion der Sensoren bei der Vermittlung von Stressresistenzen.....	28
2.1.5 Einfluss der Sensoren auf die Oberflächenadhäsion, das Pseudohyphenwachstum und die Biofilmbildung	39
2.2 Phänotypische Untersuchung von Wsc1 und Slr2 im Σ 1278b- und S288C-Stammhintergrund von <i>S. cerevisiae</i>	47
2.3 Struktur-basierte funktionelle Untersuchung der CRD-Domäne aus Wsc1	57
2.3.1 Herstellung von Wsc1-Varianten mit veränderten CRDs	57
2.3.2 Funktionelle Untersuchung der Wsc1-Varianten.....	59
3 Diskussion	63
3.1 Untersuchung der Spezifität einzelner Sensoren unter verschiedenen Bedingungen.....	63
3.2 Oberflächenwahrnehmung der Wsc- und Mid-Sensoren	72
3.3 S288C- und Σ 1278b-Stammhintergründe zeigen unterschiedliche CWI-Phänotypen.....	75
3.4 Exponierte aromatische Aminosäuren in der Wsc-Domäne sind essentiell für die Funktion des Wsc1-Sensors	79
3.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	82
4 Material.....	85
4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	85

4.2	Auftragsarbeiten	85
4.3	Verwendete Geräte und Programme	85
4.4	Antikörper	87
4.5	Puffer und Lösungen	87
4.6	Nährmedien	89
4.7	Antibiotika	90
4.8	Stämme und Plasmide	91
4.8.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	91
4.8.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	91
4.8.3	Plasmide	104
4.9	Oligonukleotide	106
5	Methoden	111
5.1	Kultivierung von Mikroorganismen	111
5.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	111
5.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	111
5.1.3	Anlegen von Dauerkulturen	111
5.2	Präparation von DNA	111
5.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse: nach (Birnboim & Doly, 1979)	111
5.2.2	Isolierung von Gesamt-DNA und Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i>	112
5.3	Manipulation von DNA	112
5.3.1	Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) (Peake, 1989)	112
5.3.2	Ortsspezifische Mutagenese: nach (Weiner <i>et al.</i> , 1994)	113
5.3.3	Restriktion von DNA	114
5.3.4	<i>In vivo</i> Ligation von DNA-Fragmenten	114
5.3.5	Fällung von DNA mit Ethanol	115
5.3.6	Analyse von DNA	115
5.4	Manipulation von Mikroorganismen	115
5.4.1	Transformationsmethoden	115
5.4.2	Integration von DNA-Kassetten in das Genom von <i>S. cerevisiae</i> zur Erzeugung von Gendelektionen und -markierungen (Janke <i>et al.</i> , 2004)	116
5.4.3	Herstellung von Hefemutanten durch Kreuzung und Tetradendisektion	116
5.5	Analyse von Proteinen	117
5.5.1	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für die Western Blot Analyse: nach (Knop <i>et al.</i> , 1999)	117
5.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	117
5.5.3	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot): nach (Towbin <i>et al.</i> , 1979)	118
5.5.4	Bestimmung der Proteinstabilität	118
5.6	Untersuchung von <i>S. cerevisiae</i>	119
5.6.1	Fluoreszenzmikroskopie von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	119
5.6.2	Immunfluoreszenz-Analyse von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	119

5.6.3	Tropftest mit <i>S. cerevisiae</i>	120
5.6.4	Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar	120
5.6.5	Test auf Pseudohyphenbildung: nach (Gimeno <i>et al.</i> , 1992)	120
5.6.6	Biofilmbildung auf halbfestem Agar	120
5.6.7	Phosphorylierungs-Assay mit verschiedenen Stressen	120
5.6.8	Resazurin-Assay mit verschiedenen Stressen	121
5.6.9	Bestimmung des Glucangehalts.....	121
5.6.10	Bestimmung des Chitingehaltes.....	121
6	Literaturverzeichnis	123
7	Abbildungsverzeichnis	137
	Erklärung	139
	Danksagung	141
	Lebenslauf.....	142

1 Einleitung

1.1 Pilzliche Oberflächenwahrnehmung und Mechanosensoren

In der Natur müssen sich Organismen fortlaufend an eine verändernde Umwelt anpassen, um ihr Überleben zu garantieren. Dabei gibt es vielfältige und unterschiedlichste Umwelteinflüsse, die ein- und mehrzellige Organismen immer wieder vor neue Herausforderungen stellen. Dazu zählen äußere Einwirkungen, wie z.B. Änderungen des Nährstoffangebotes, der Pheromonanwesenheit, des Sauerstoffgehalts und der Lichtverhältnisse, aber auch verschiedenste Stresse (Kumamoto, 2008; Bahn *et al.*, 2007). Für Lebewesen ist es deshalb von großer Bedeutung, dass sie diese Änderungen wahrnehmen können und je nach Umweltbedingung adäquate zelluläre Antworten auslösen können. Wie alle Organismen haben Pilze spezialisierte Systeme für die Wahrnehmung äußerer Reize entwickelt. Mit diesen können sie fast alle Einflüsse verarbeiten, die auch höhere Lebewesen, wie z.B. Menschen, erfassen können (Bahn *et al.*, 2007). Neben den oben genannten Einwirkungen ist für pilzliche Zellen auch der Kontakt zu Oberflächen und anderen Organismen ein wichtiges Signal. Im Gegensatz zu Humanzellen, für die der Kontakt unter anderem ein Signal für Zellproliferation und Differenziation darstellt, ist spezifischer Kontakt zu Oberflächen oder einem Wirt für beispielsweise pathogene Pilze ein wichtiges Signal für ihre Virulenz (Kumamoto, 2008). Sowohl pilzliche Human- und Zoopathogene, als auch pilzliche Pflanzenpathogene reagieren auf Kontakt zu geeigneten Oberflächen mit auf die Infektion spezialisierten Differenzierungsprogrammen, wie der Ausbildung von Appressorien oder invasiven Hyphen (Tucker & Talbot, 2001; Kumamoto & Vincles, 2005). Als Appressorien werden verdickte Hyphenenden bezeichnet, die dem pathogenen Pilz helfen, sich am Wirt anzuheften. Doch auch nicht-pathogene Pilze, wie *Saccharomyces cerevisiae*, reagieren mit differenzierten Wachstumsformen auf Kontakt zu unterschiedlichen Oberflächen oder anderen Zellen. So bilden sie je nach Oberfläche und Umwelt Biofilme, Pseudohyphen oder andere invasive Strukturen (Honigberg, 2011; Cullen & Sprague, 2012; Reynolds & Fink, 2001; Roberts & Fink, 1994). Haben Hefezellen z. B. Kontakt zu festem Agarmedium oder Plastik, bilden sie einen adhärenen Biofilm, wachsen sie auf halbfestem Medium, bilden sie kreisförmige, strukturierte Biofilme (Abbildung 1). Die Bildung beider Formen des Biofilmes ist, zusätzlich zur Kontaktwahrnehmung, sowohl abhängig vom Nährstoffangebot, als auch vom pH-Wert der Wachstums Umgebung (Brückner & Mösch, 2012; Roberts & Fink, 1994; Reynolds & Fink, 2001).

Im Allgemeinen ist nicht bekannt, wie genau Pilze Oberflächenkontakt wahrnehmen. Es wird jedoch vermutet, dass Mechanosensoren dabei eine Rolle spielen könnten. Es wird dabei angenommen, dass durch Kontakt zu Oberflächen und anderen Organismen mechanische Kräfte auf die Zellwand und Plasmamembran wirken, welche dann durch diese Sensoren detektiert werden (Kumamoto, 2008). In Pilzen werden verschiedene Arten von Mechanosensoren vermutet. Zum einen wird angenommen,

dass man in diesen Organismen mechanosensitive Ionenkanäle (MS Kanäle) findet, die in ähnlicher Form in Bakterien vorkommen und in diesen bereits im Detail untersucht wurden. Die Öffnung der bakteriellen Kanäle wird durch physikalische Störungen der Membran gesteuert, wobei eine Unterscheidung verschiedener Arten von Kanälen gemacht werden kann (Booth *et al.*, 2007). In Pilzen sind die Untersuchungen bezüglich MS Kanäle noch nicht entsprechend weit fortgeschritten, jedoch

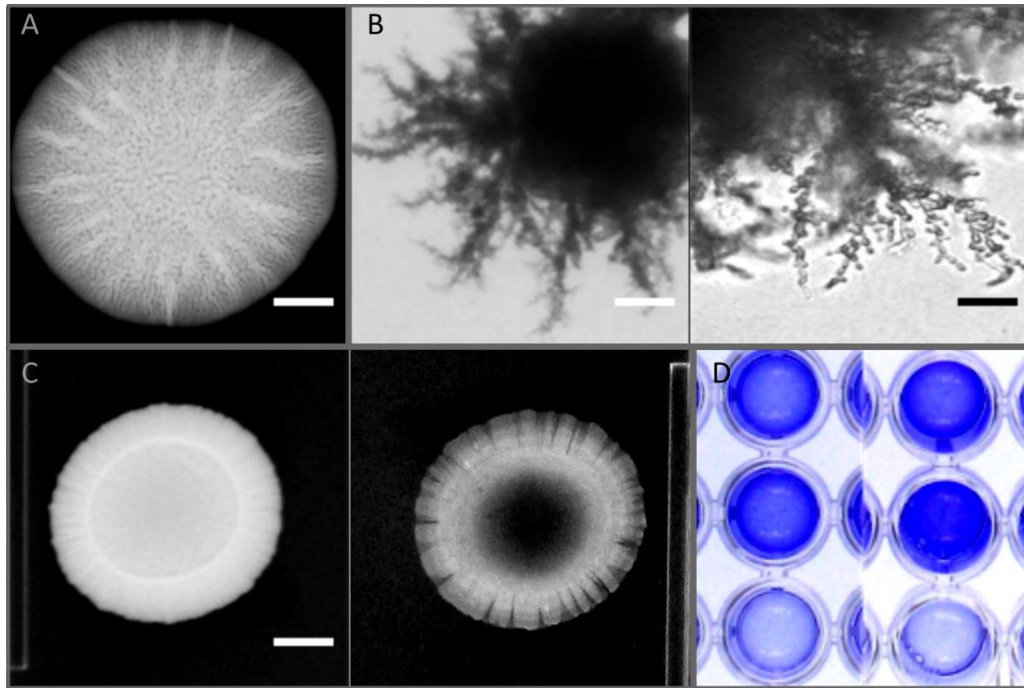


Abbildung 1: Verschiedene Wachstumsformen von *S. cerevisiae*. Gezeigt sind: A: Biofilm auf halbfestem Medium Größenmarker=0,5 cm. B: Pseudohyphenwachstum auf festem Medium mit Stickstoffmangel. Weißer Größenmarker=100 µm, schwarzer Größenmarker= 20 µm. C: adhärenter Biofilm auf festem Medium, absolutes Wachstum (links), invasives Wachstum nach Abwaschen der Zellen (rechts). Größenmarker=0,5 cm. D: Biofilmbildung auf Polystyrol nach Inkubation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 %, 0,2 %, 2 %, von unten nach oben), angefärbt mit Kristallviolett. A und C: YHUM0463, B: YHUM0463 gekreuzt mit YHUM2893, D: YHUM0454.

wurden an der Zellmembran mehrerer Pilze Aktivitäten gemessen, die auf MS Kanäle hindeuten (Zhou *et al.*, 1991; Watts *et al.*, 1998). Diese spielen vermutlich sowohl im Bohnenrost-Erreger *Uromyces appendiculatus*, als auch im Humanpathogen *Candida albicans* eine Rolle bei der Infektion des Wirtes, da eine Aktivität der vermuteten Kanäle in den Appressorien bzw. invasiven Hyphen gemessen wurde, mit denen die Pilze sich an geeignetes Wirtsgewebe vortasten (Watts *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1991; Kumamoto, 2008).

Eine weitere Klasse der Mechanosensoren in Pilzen sollen mechanosensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GP-Rezeptoren) darstellen. GP-Rezeptoren fassen eine große Gruppe eukaryotischer Rezeptoren zusammen und sind für die Erkennung einer Vielzahl von äußeren Signalen, wie z.B. verschiedenste Liganden, Pheromone oder Licht verantwortlich (Weis & Kobilka, 2018). So konnte gezeigt werden, dass GP-Rezeptoren nicht nur auf Ligandenbindung, sondern auch auf mechanische Einflüsse in der Zellmembran reagieren, die anschließend für die Signalweiterleitung durch eine Konformationsänderung des Rezeptors sorgen (Chachisvilis *et al.*, 2006; Makino *et al.*, 2006). Es wird

vermutet, dass mechanosensitive GP-Rezeptoren im Pflanzenpathogen *Magnaporthe grisea* an der Appressorien-, bei *C. albicans* bei der Hyphen- und bei *S. cerevisiae* bei der Pseudohyphen-Bildung beteiligt sein könnten (Kumamoto, 2008).

Weitere pilzliche Mechanosensoren könnten Integrin-ähnliche Proteine bilden. Integrine sind hauptsächlich aus Säugetiierzellen bekannte Transmembranproteine, welche eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und Teilen des Zytoskelett schaffen und Kräfte detektieren, die senkrecht auf die Membran wirken (Bershadsky *et al.*, 2003; Katsumi *et al.*, 2004). Auch in Pilzen ist es vorstellbar, dass Integrin-ähnliche Proteine die Zellwand mit der Plasmamembran verbinden und mechanische Einflüsse dort detektieren könnten (Kumamoto, 2008).

Eine weitere Proteinfamilie, die aus den Sensoren des Zellwandintegritäts-Signalweges („Cell Wall Integrity Pathway“, CWI) besteht, soll ebenfalls zu den Mechanosensoren gehören. In *S. cerevisiae* werden die Proteine Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 zu dieser Familie gezählt. Unter anderem wurde festgestellt, dass diese Sensoren eine federförmige, Serin- und Threonin-reiche Domäne tragen. Über eine Rasterkraftmikroskopie-Technik („Atomic Force Microscopy“, AFM) wurde gezeigt, dass der extrazelluläre Teil des zu dieser Familie gehörenden Sensors Wsc1 aus *S. cerevisiae* Eigenschaften einer „Hookeschen“ Feder aufweist. Der federförmige Teil verbindet einen in der Zellwand liegenden Teil des Proteins mit der Plasmamembran und soll so mechanische Signale auf die Zellwand an das Zellinnere weitergeben können. (Kock *et al.*, 2015; Heinisch, Dupres & Alsteens *et al.*, 2010). Außerdem wurde für den Sensor Wsc1 bereits eine Beteiligung an pseudohyphalen Wachstum und Biofilmbildung auf halbfestem Agarmedium publiziert (Shively *et al.*, 2013; Sarode *et al.*, 2014).

Allerdings ist noch nicht endgültig geklärt, ob diese Sensoren tatsächlich eine mechanosensitive Funktion besitzen, zudem ist der zugrundeliegende Mechanismus der Mechanosensitivität dieser Proteine und auch anderer Sensoren ebenfalls noch nicht ausreichend verstanden. Dies macht weitere Untersuchungen der Sensoren und des generellen Wahrnehmens von Kontakt und mechanischen Einflüssen nötig.

1.2 Der Modellorganismus *S. cerevisiae*

Die Brau- und Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird seit Jahrtausenden auf Grund ihrer Fähigkeit, auch in aeroben Umgebungen Zucker zu Ethanol umzuwandeln, von Menschen verwendet, um alltägliche Lebensmittel, wie Brot, Bier und Wein herzustellen (Fiechter *et al.*, 1981; Cavalieri *et al.*, 2003; McGovern *et al.*, 2004). Zusätzlich ist diese Hefe in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen und beliebten eukaryotischen Modellorganismus in der Grundlagenforschung geworden. Da es vergleichsweise unkompliziert ist, Mutanten in diesem pilzlichen Organismen herzustellen, können relativ einfach Verbindungen zwischen Genen, Proteinen und deren Funktionen in der Zelle untersucht

werden (Botstein & Fink, 1988; Botstein & Fink, 2011). Zudem zeichnet sich *S. cerevisiae* als Modellorganismus durch eine leichte und kostengünstige Handhabung im Labor aus. Als eukaryotischer Mikroorganismus wächst die Hefe vergleichsweise schnell, ist prinzipiell gut zugänglich für molekulargenetischen Methoden und verfügt zudem über zelluläre Strukturen, wie z.B. Zellwand, Organellen und ein Zytoskelett, die eine zellbiologische Untersuchung interessant und möglich machen (Botstein & Fink, 1988). Schon 1996 wurde durch eine internationale Zusammenarbeit das gesamte Genom von *S. cerevisiae* sequenziert. Daraus ergab sich die Möglichkeit, neben der Vereinfachung der genetischen Analyse, die Hefe auch weiter evolutionär zu untersuchen, da durch die komplette Sequenz auch der Aufbau der 16 Chromosomen verdeutlicht werden konnte (Goffeau *et al.*, 1996).

In der Forschung werden verschiedenste *S. cerevisiae*-Stämme verwendet. S288C ist der am meisten benutzte Hefestamm, darüber hinaus sind viele ebenfalls gerne verwendete Laborstämme eng mit S288C verwandt (Louis, 2016). Einer dieser nah mit S288C verwandten Stämme ist der Σ 1278b-Stamm. Beide Stammhintergründe sind genetisch zwar sehr ähnlich, jedoch wurde festgestellt, dass einige Gene in einem der Stammhintergründe essentiell sind, während die selben Gene im anderen nicht überlebensnotwendig sind (Dowell *et al.*, 2010). Solche Unterschiede zwischen den Stammhintergründen kann man sich je Experiment zu Nutze machen. So können in Zellen des Σ 1278b-Hintergrunds bestimmte Wachstumsformen, wie z.B. Pseudohyphenwachstum oder Agar-Adhäsion beobachtet werden, dagegen ist dies im S288C-Stamm nicht möglich (Liu *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996).

Im Labor können Zellen der *S. cerevisiae*-Stämme sowohl in einer haploiden Form, bei der man zwei Geschlechtstypen, *MATa* und *MAT α* , unterscheidet, als auch in der diploiden Form verwendet werden und je nach Nährstoffangebot können sie in unterschiedlichen Wachstumsformen auftreten (Abbildung 2). Sowohl haploide, als auch diploide Zellen befinden sich bei ausreichendem Nährstoffangebot im vegetativen oder hefeartigen Wachstum und vermehren sich durch Sprossung. Dabei produziert die Mutterzelle eine komplett neue Tochterzelle, die sich dann von ihr abschnürt (Hartwell, 1974). Die Zellen stellen die Vermehrung durch die Sprossung ein, wenn sich das Nährstoffangebot verschlechtert und verbleiben daraufhin in der G1- oder stationären Phase. Treffen zwei haploide Zellen beider Geschlechtstypen in unmittelbarer Nähe zusammen, konjugieren diese zu diploiden Zellen. Auch bei diesem Vorgang beenden die Zellen zunächst die Sprossung und gehen in die stationäre Phase über (Hartwell, 1974). Versetzt man diploide Zellen in eine Umgebung ohne fermentierbare Kohlenstoffquelle und ohne ausreichend Stickstoff, teilen sie sich meiotisch und gehen in die Sporulation über, bei der im Idealfall vier sehr widerstandsfähige Sporen entstehen (Esposito & Klapholtz, 1981). Diploide Zellen verändern außerdem ihre Wachstumsform vom hefeartigen Wachstum zu einer pseudohyphalen Form, wenn die Zellen bei Stickstoffmangel, aber in Anwesenheit

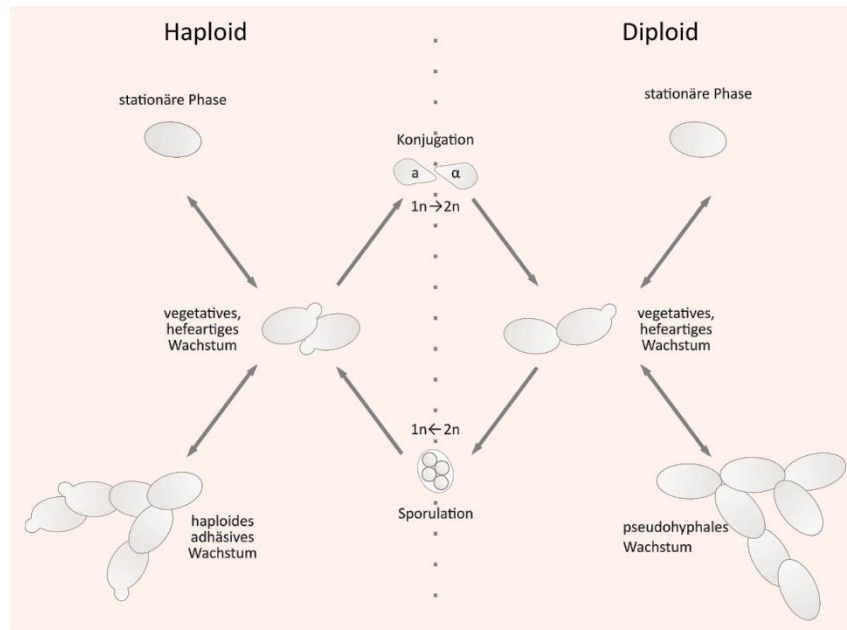


Abbildung 2: Lebenszyklus von *S. cerevisiae*. Hefezellen können in haploider und diploider Form vorkommen. Je nach Nährstoffangebot differenziert sich ihr Wachstumsbild. Bei gutem Nährstoffangebot vermehren sich die Zellen durch Sprossung. Bei Stickstoffmangel, aber ausreichendem Glukoseangebot, können diploide Hefen, die durch Konjugation zweier haploider Zellen unterschiedlichen Geschlechts entstehen, pseudohyphal wachsen. Bei Glukosemangel zeigen auch haploide Zellen ein kettenförmiges, adhäsives Wachstum. Besteht Kohlenstoff- und Stickstoffmangel, so kommt es bei Diploiden zur Sporulation. Bei allgemein schlechtem Nährstoffangebot verbleiben haploide und diploide Zellen in der stationären Phase.

einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen müssen. Das Pseudohyphenwachstum zeichnet sich durch unipolare gesprossete, verlängerte Zellen und ein invasives Wachstumsbild der Zellketten aus (Gimeno *et al.*, 1992). Dieser Phänotyp des invasiven, pseudohyphalen Wachstums ist abhängig vom Flokkulin Flo11 (Lo & Dranginis, 1998). Flo11 ist ein GPI-verankertes Glykoprotein und gehört zu einer Proteingruppe, die Adhäsiine genannt wird (Verstrepen & Klis, 2006; Brückner & Mösch, 2012). Auch bei haploiden Zellen ist ein invasives, oder adhäsives Wachstum bei Kohlenstoffmangel möglich (Abbildung 2). Dabei wachsen die Zellen zwar ebenfalls kettenförmig, sind aber in sich kaum verlängert und sprossen bipolar (Roberts & Fink, 1994). Auch dieses adhäsive Wachstum ist von Flo11 abhängig (Lo & Dranginis, 1998).

1.3 Die Zellwand von *S. cerevisiae*

Sowohl Pflanzen, Bakterien, Algen, als auch Pilze besitzen als äußere Abgrenzung neben der Zellmembran eine feste Zellwand (Abbildung 3). Die Zellwand von Pilzen, wie *S. cerevisiae*, hat eine essentielle Bedeutung für das Überleben der Zellen. So dient die Zellwand zuerst als äußere Barriere und als physikalischer Schutz vor diversen Einwirkungen auf die Zelle. Sie wird außerdem auch als Hilfe zur Aufrechterhaltung der Osmolarität des Zytoplasmas gebraucht, da diese innerhalb der Zellen oft höher ist, als in der Umgebung und die Zellen ohne feste Wand zerbersten würden (Klis *et al.*, 2006). Zudem benötigen die Zellen ihre Zellwand, um je nach Umgebung und äußeren Einflüssen, die Form anzupassen, z.B. bei der Bildung von Pseudohyphen, Sporen, bei der Konjugation zweier Zellen und bei

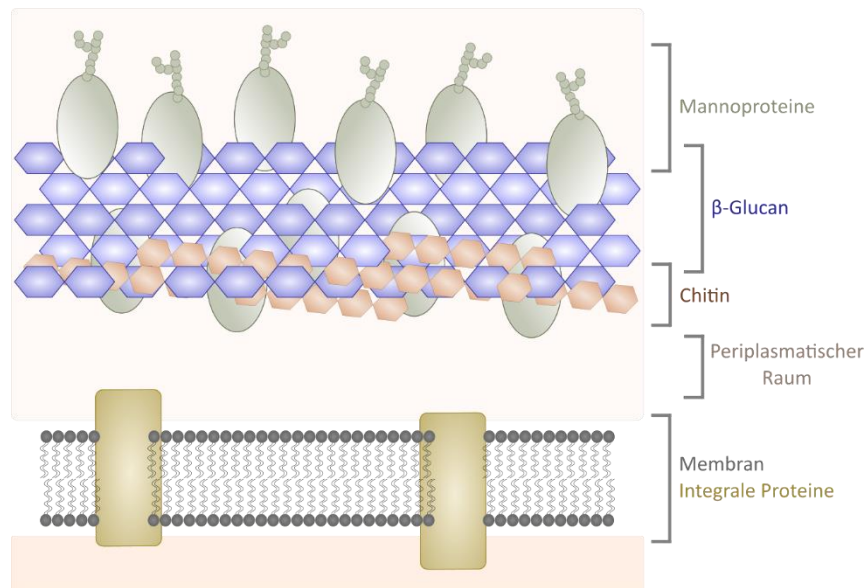


Abbildung 3: Aufbau der *S. cerevisiae*-Zellwand. Die Zellwand der Hefe ist grundsätzlich in zwei Schichten aufgebaut. Die äußere Schicht besteht dabei aus Mannoproteinen, während die innere Schicht aus einem Geflecht aus β -1,3-Glucan, β -1,6-Glucan und Chitin aufgebaut ist. Die Zellwand ist durch einen periplasmatischen Raum von der Plasmamembran getrennt.

der Sprossung. Eine weitere wichtige Funktion der Hefezellwand ist, dass sie als eine Art Gerüst viele unterschiedliche Zellwandproteine trägt (Klis *et al.*, 2006; Orlean, 2012). Um ihre Funktionalität zu garantieren, muss der Aufbau und die Zusammensetzung der Zellwand gleichzeitig stabil und flexibel sein. So ändert sich die Masse der Zellwand im Vergleich zur Gesamtzellmasse z.B. je nach Wachstumsbedingung. In Vollmedium zeigte sich, dass die Masse der *S. cerevisiae*-Zellwand ca. 20 % der Gesamtzellmasse einnahm, während sie bei Wachstum der Zellen in Ethanol-haltigem Medium auf 10 %-12 % sank. Noch dazu ist, je nach Wachstumsbedingung, auch die generelle Zusammensetzung und die allgemeine Dicke der Zellwand verändert (Aguilar-Uscanga & Francois, 2003).

Die Hauptbestandteile der Hefezellwand sind die Polysaccharide Chitin, β -1,3-Glucan, β -1,6-Glucan sowie verschiedene Mannoproteine (Orlean, 2012). Dabei bilden das Chitin und die Glucane die innere Schicht der Zellwand, während die Mannoproteine die nach außen gerichtete Schicht stellen (Levin, 2011) (Abbildung 3). Das Chitin bildet mit nur ca. 2 % der Gesamtzellwandmasse in Zellen, die keinerlei Stress ausgesetzt sind, den kleinsten Bestandteil der inneren Schicht. Jedoch kann die Menge auf bis zu 20 % der Masse ansteigen, wenn in den Zellen Mutationen vorhanden sind, die Zellwandstress auslösen (Levin, 2011; Orlean, 2012; Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). Das β -1,3-Glucan dagegen macht den größten Teil der inneren Zellwandschicht aus. Das β -1,3-Glucan ist verzweigt und bildet ein dreidimensionales Netzwerk, welches sich durch gleichzeitige Festigkeit und Elastizität auszeichnet (Klis *et al.*, 2006; Manners *et al.*, 1973).

Die drei Polysaccharide sind auf verschiedene Arten miteinander verknüpft. Es wird vermutet, dass ca. die Hälfte des Chitins über eine β -1,4-Verknüpfung mit dem β -1,3-Glucan verbunden ist (Kollár *et al.*, 1995). Außerdem ist Chitin über ein reduzierendes Ende mit dem nicht-reduzierenden Ende des

β -1,6-Glucans verknüpft. Darüber hinaus kann das reduzierende Ende des β -1,6-Glucans mit dem β -1-3-Glucan verbunden sein (Kollár *et al.*, 1997).

Bei den Mannoproteinen, welche die äußere Schicht der Zellwand bilden, lassen sich hauptsächlich zwei verschiedene Proteinklassen unterscheiden, die kovalent an die Polysaccharide der inneren Schicht gebunden sind (Klis *et al.*, 2002). Zum einen finden sich dort die Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankerten Proteine. Diese Proteine können über ihren GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden sein, wird dieser Anker jedoch teilweise entfernt, so können die Proteine mit dem β -1,3-Glucannetzwerk indirekt über das β -1,6-Glucan verknüpft werden (Kollár *et al.*, 1997; Klis *et al.*, 2006). Zum anderen gibt es die PIR-Proteine („Proteins with internal repeats“), die direkt an das β -1,3-Glucannetzwerk geknüpft sind (Klis *et al.*, 2002).

1.4 Der Zellwandintegritäts-Signalweg in *S. cerevisiae*

Die vielfältigen und essentiellen Funktionen der Zellwand für das Überleben der Zellen machen den Erhalt und die Anpassung der Zellwand an verschiedene Bedingungen und Wachstumsphasen zu einer entscheidenden Aufgabe innerhalb der Zelle. Die Integrität der Zellwand muss selbst dann erhalten bleiben, wenn die Zellen z.B. Zellwand-spezifischen Stressen ausgesetzt sind. Wirken unter anderem diese auf die Zelle ein, so hat der Zellwandintegritäts-Signalweg („Cell Wall Integrity Pathway“, CWI) die Aufgabe, die Unversehrtheit der Zellwand zu garantieren (Levin, 2011). Der CWI ist eine Signaltransduktionskaskade, die in Pilzen über eine Sensorfamilie Zellwandstress detektiert und das Signal über eine kleine GTPase und eine anschließende Proteinkaskade zu Effektoren im Zellkern weiterleitet, die die Integrität der Zellwand gewährleisten sollen (Abbildung 4) (Levin, 2005). Der CWI ist in seinem generellen Aufbau stark konserviert bei Pilzen und es wird angenommen, dass nicht nur unter Stressbedingungen eine Aktivität des Signalwegs nötig ist, sondern auch unter normalen Wachstumsbedingungen eine Grundaktivierung des CWI vorhanden ist (Dichtl *et al.*, 2016).

Am besten charakterisiert ist der CWI der Hefe *S. cerevisiae* (Dichtl *et al.*, 2016; Levin, 2011; Levin, 2005). Einer der wichtigsten Regulatoren im CWI ist die kleine GTPase Rho1. Diese ist in der Hefe nicht nur essentiell, um die auf die Zellwand wirkenden Signale an die Zelle weiterzuleiten, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der generellen Zellwandbiogenese, der Aktin-Zytoskelett Organisation und beim Zellzyklus (Levin, 2011). Wirken auf die Zelle Zellwand-spezifische Stresse, wird vermutet, dass die Sensoren des CWI (Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1) die Konformation ändern, sich gruppieren und mit dem GTP-Austauschfaktor Rom2 („Guanosine Exchange Factor“, GEF) über ihren zytoplasmatischen Teil interagieren (Kock *et al.*, 2015; Philip & Levin, 2001). Die beiden GEFs Rom2 und sein Paralog Rom1 können überlappende Funktionen übernehmen und sie gelten als Rho1 spezifische Aktivatoren. Eine Doppeldeletion beider GEFs führt zum Sterben der Zellen (Ozaki *et al.*, 1996). Das von den Sensoren rekrutierte Rom2 kann anschließend Rho1 aktivieren, indem es das in

der inaktiven Form von Rho1 gebundene GDP (Guanosindiphosphat) in ein GTP (Guanosintriphosphat) umtauscht (Levin, 2011; Ozaki *et al.*, 1996). Die derart aktivierte GTPase Rho1 aktiviert wiederum die Serin/Threonin-Proteinkinase Pkc1 (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). In seiner aktivierten Form stößt Pkc1 anschließend eine mehrstufige Signaltransduktionskette (MAPK-Kaskade, „Mitogen Activated Protein Kinase“) an. MAPK-Kaskaden haben den Vorteil, dass sie über

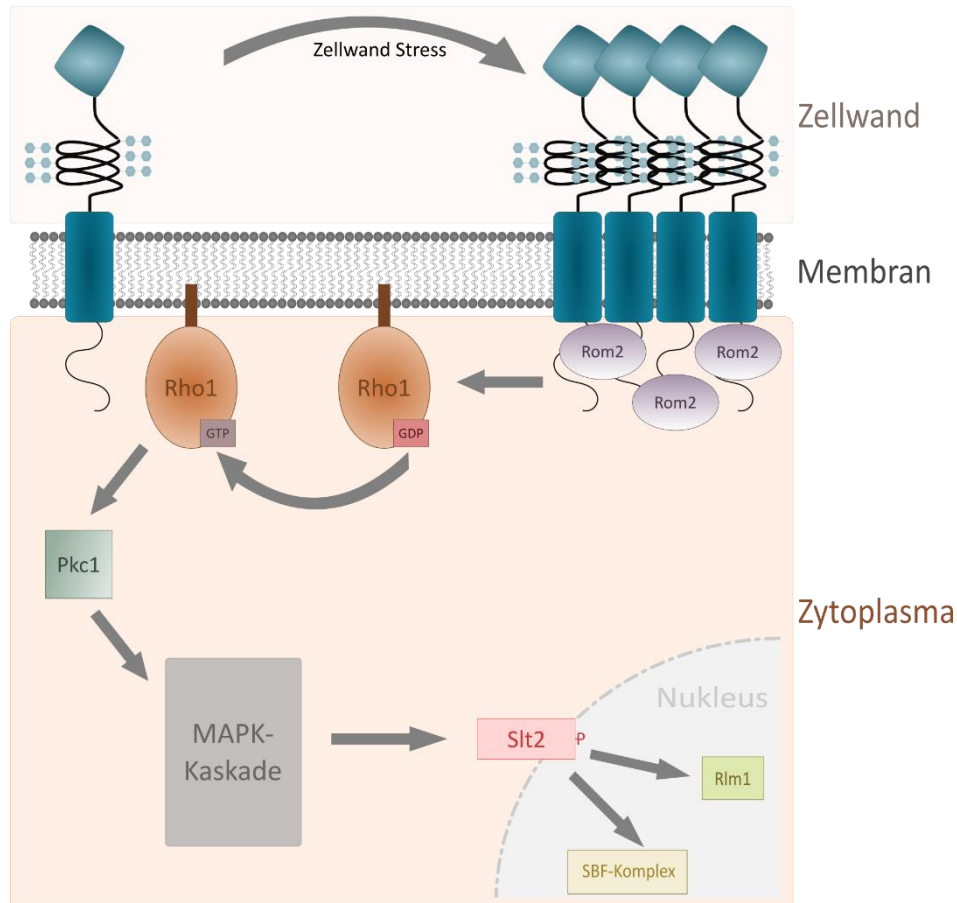


Abbildung 4: Aktuelles Modell des Zellwandintegritäts-Signalwegs. Durch Zellwandstress gruppieren die Sensoren und verändern ihre Konformation. Dadurch kann das GEF Rom2 die GTPase Rho1 aktivieren, die wiederum Pkc1 und somit eine MAPK-Kaskade aktiviert. Durch eine anschließende Phosphorylierung von Slt2 werden Transkriptionsfaktoren (Rlm1 und SBF-Komplex) aktiviert und Zielgene für die Zellwandbiogenese und Zellzyklus abgelesen (Kock *et al.*, 2015).

ihre Mehrstufigkeit Signale verstärken und sie so in eine hoch spezifische Antwort umwandeln können (Ferrell, 1996; Huang & Ferrell, 1996). Die lineare Kaskade startet mit Pkc1, welche die MAP3K (MAP-Kinase Kinase Kinase) Bck1 aktiviert, welches anschließend die MAP2K (MAP-Kinase Kinase) Mkk1 und Mkk2 aktiviert. Diese wiederum aktivieren die MAP-Kinase (MAPK) Slt2, welche auch Mpk1 genannt wird (Levin, 2011; Levin, 2005; Kock *et al.*, 2015). Zusätzlich zu Slt2 wird die Pseudokinase Kdx1 von Mkk1 und Mkk2 aktiviert, die redundant einige nicht-katalytische Aufgaben von Slt2 im CWI übernehmen kann (Kim *et al.*, 2008; Kim & Levin, 2010; Watanabe *et al.*, 1997). Slt2 wirkt hauptsächlich auf zwei Transkriptionsfaktoren: Rlm1 und den SBF-Komplex (Abbildung 4) (Watanabe *et al.*, 1995; Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). Der Zellkern-lokalisierte Transkriptionsfaktor Rlm1 wird von Slt2 über Phosphorylierung aktiviert und vermittelt Slt2-abhängig die Regulation von ca. 25 Genen, die

ausnahmslos entweder selbst für Zellwandproteine codieren, oder deren Genprodukte an der Zellwandbiogenese beteiligt sind (Jung & Levin, 1999; Watanabe *et al.*, 1997). Zwei dieser Gene codieren für die bereits erwähnten CWI-Proteine, die Kinase Slt2 und ihr Paralog Kdx1. Diese werden von Rlm1 positiv reguliert, was auf einen positiven „feedback“-Mechanismus hinweist, der helfen kann, die Menge der zwei Proteine unter Stressbedingungen zu erhalten (Sanz *et al.*, 2017; Jung & Levin, 1999). Der SBF-Komplex besteht aus den beiden Proteinen Swi4 und Swi6 und ist hauptsächlich für die Regulation der Transkription in der späten G1-Phase des Zellzyklus zuständig (Breedon, 2003). Er wird bei Zellwandstress, unabhängig von seiner Aufgabe in der G1-Phase, von Slt2 und Kdx1 in einer nicht-katalytischen Weise aktiviert (Kim & Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008).

Das als Hauptbestandteil der Zellwand essentielle β -1,3-Glucan wird von einem Enzymkomplex produziert, dessen zwei Hauptuntereinheiten von den Genen *FKS1* und *FKS2* codiert werden. Auch Rho1 ist ein Teil des Komplexes. Es wurde gezeigt, dass unter normalen Bedingungen das Gen *FKS1* exprimiert wird, wobei die Regulation während des Zellzyklus vom SBF-Komplex übernommen wird. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Expression von *FKS1* durch Rlm1 bei einer CWI-Aktivierung angeregt wird. *FKS2* dagegen wird unter normalen Bedingungen nur wenig hergestellt, doch die Expression wird z.B. bei Zellwandstress erhöht. Dies geschieht über die nicht-katalytische Aktivierung des SBF-Komplexes durch Slt2 (Review: (Levin, 2011). Auch die Menge des Zellwandbestandteils Chitin wird unter Stress erhöht. Dies wird durch eine Chitinsynthase (Chs3) katalysiert. Daran beteiligt sind unter anderem sowohl die CWI-Kinase Pkc1, als auch der Transkriptionsfaktor Rlm1 (Levin, 2011).

Generell wird der CWI bei allen Vorgängen in der Zelle aktiviert, die Einfluss auf die Zellwand nehmen oder eine Ausdehnung oder Streckung der Plasmamembran verursachen (Levin, 2011; Levin, 2005). Diese Aktivierung lässt sich über den phosphorylierten Zustand der Kinase Slt2 erkennen. Diese Phosphorylierung ist z.B. einfach mit Hilfe eines Antikörpers, welcher die phosphorylierte Version von Slt2 erkennt, nachzuweisen (Martin *et al.*, 2000).

Der CWI ist während des Zellzyklus streng reguliert. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des CWI innerhalb des Zellzyklus immer dann am stärksten ist, wenn es zur Sprossung einer Tochterzelle kommt oder wenn sich die Zelle aufgrund des Einflusses von Pheromonen verformt („Shmooing“), folglich, wenn es zu polarisiertem Wachstum kommt (Zarrov *et al.*, 1996). Auch ein Hitzeschock kann den CWI aktivieren. Dabei zeigt sich allerdings, dass es wohl keine direkte sondern eine indirekte Aktivierung des CWI ist, die durch sekundäre Ereignisse ausgelöst wird, da eine Slt2-Aktivierung erst nach 20 bis 30 Minuten detektierbar ist (Levin, 2005; Kamada *et al.*, 1995). Eine vergleichsweise sehr schnelle, jedoch auch sehr kurzlebige Aktivierung des CWI ereignet sich bei einem hypoosmotischen Schock (Levin, 2011; Gustin *et al.*, 1998). Es gibt zudem auch mehrere Hinweise darauf, dass eine Aktivierung des CWI eine Rolle für das Endoplasmatische Retikulum (ER) spielt, wenn dieses spezifischem ER-Stress wie z.B. Tunicamycin oder Dithiothreitol (DTT) ausgesetzt wird (Chen *et al.*, 2005). Außerdem wird der

CWI aktiviert, wenn in der DNA der Zellen Mutationen eingebracht wurden, die die Zellwandbiogenese stören (Nobel *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2003). Natürlich sorgen auch chemische Substanzen, die Zellwandstress auslösen für eine CWI-Aktivierung. Dazu zählen, unter anderen: 1. Calcofluorweiß und Kongorot, die sich in das Zellwandgeflecht einlagern und so dessen Stabilität stören, 2. der Glucansynthase-Hemmer Caspofungin, 3. die Zellwand lysierende Zymolyase und 4. Koffein, welches zwar vermutlich keinen klassischen Zellwandstress auslöst, jedoch nachweislich den CWI aktiviert (Ram & Klis, 2006; Kopecka & Gabriel, 1992; Roncero & Durán, 1985; Vannini *et al.*, 1983; Deresinski & Stevens, 2003; Kuranda *et al.*, 2006a; Martín *et al.*, 2000; Bermejo *et al.*, 2010; Bermejo *et al.*, 2008; Reinoso-Martín *et al.*, 2003).

1.5 Die Sensoren des Zellwandintegritäts-Signalwegs

1.5.1 Allgemeiner Aufbau und Struktur der Sensoren

Der Zellwandintegritäts-Signalweg (CWI) beinhaltet in *S. cerevisiae* eine Sensorfamilie, die aus fünf Proteinen besteht. Zu dieser Familie zählen die Sensoren der Wsc-Gruppe Wsc1, Wsc2 und Wsc3 („Cell Wall Integrity and Stress Response Component“) und die der Mid-Gruppe Mid2 („Mating Pheromone Induced Death“) und Mtl1 (Mid-Two Like) (Rodicio & Heinisch, 2010). Ein weiteres Wsc-Protein stellt Wsc4 dar, dass im ER lokalisiert und deshalb bisher nicht zu den CWI-Sensoren gezählt wird (Mamoun *et al.*, 1999).

Im Allgemeinen ist die Architektur aller Wsc-/Mid-Sensoren vergleichbar, wobei die Sequenzen der einzelnen Sensoren nur geringe Übereinstimmungen aufweisen (Abbildung 5). So stellt man zwischen Wsc1 und Wsc2/Wsc3 eine paarweise Identität („pairwise identity“) von knapp 30 %, zwischen den Paralogen Wsc2 und Wsc3 von ca. 45 % und zwischen den Paralogen Mid2 und Mtl1 ca. 44 % fest (Rodicio & Heinisch, 2010; Kock *et al.*, 2015). Alle Sensoren des CWI besitzen eine Signalsequenz, eine Transmembrandomäne, einen zytoplasmatischen Teil, eine Serin- und Threonin-reiche extrazelluläre Domäne und eine ebenfalls extrazelluläre Kopfgruppe (Abbildung 5) (Kock *et al.*, 2015; Levin, 2011; Rodicio & Heinisch, 2010). Für Wsc1 wurde gezeigt, dass alle Domänen essentiell für die Funktion des Sensors sind (Lodder *et al.*, 1999b). Der größte Unterschied zwischen den zwei Gruppen der Familie liegt in der Kopfgruppe. Die Wsc-Gruppe trägt an seinem N-Terminus eine Cystein-reiche („Cystein-Rich-Domain“, CRD) oder Wsc-Domäne, während die Proteine der Mid-Gruppe lediglich einen N-glykosylierten Asparaginrest als eine Art Kopfgruppe besitzen (Kock *et al.*, 2015).

Zytoplasmatischer Teil

Der zytoplasmatische Teil der Sensoren dient bei z.B. Zellwandstress der Signalweiterleitung. Für Wsc1 und Mid2 wurde durch eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse („Yeast-Two-Hybrid“, Y2H) festgestellt, dass der

zytoplasmatische Teil mit dem GEF Rom2 interagiert (Philip & Levin, 2001). Eine Untersuchung der

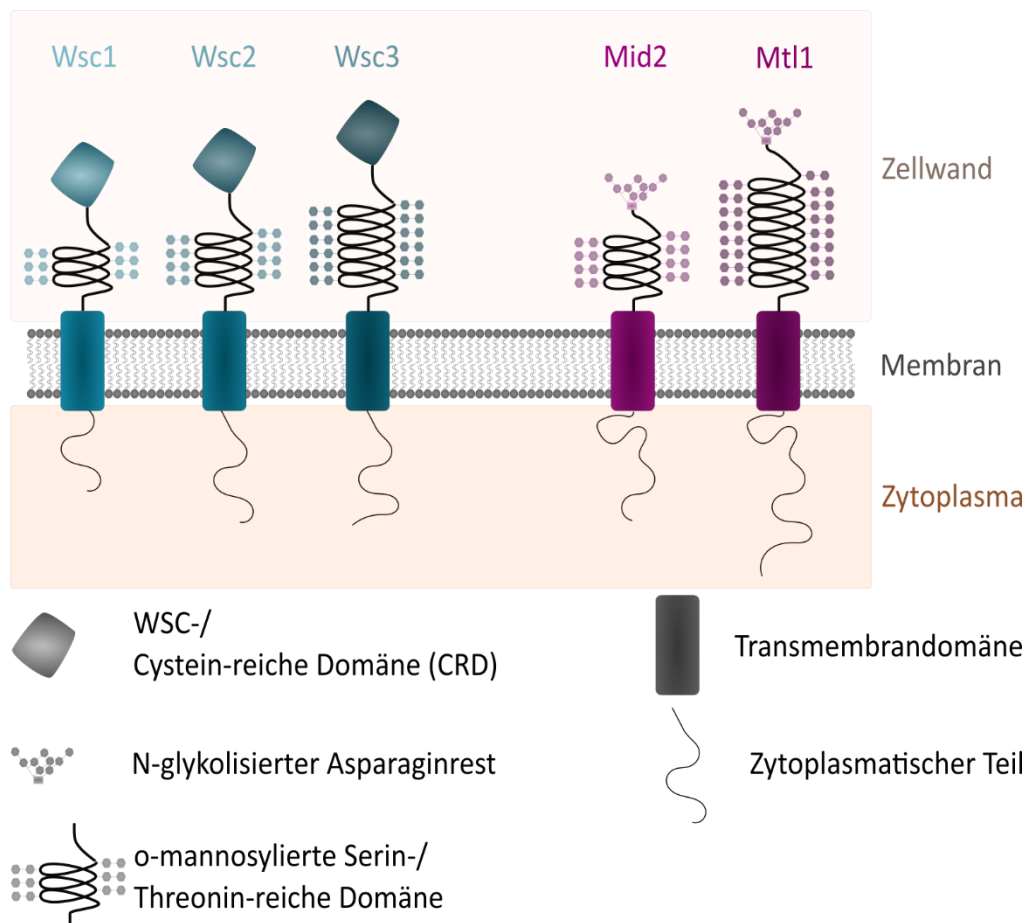


Abbildung 5: Schema der Wsc-/Mid-Sensorfamilie. Die generelle Architektur der Sensoren ist bei allen fünf Proteinen erhalten. Es findet sich ein unstrukturierter zytoplasmatischer Teil, eine Transmembrandomäne, eine federförmige Serin-/Threonin-reiche, extrazelluläre Domäne und am N-Terminus bei Wsc1, Wsc2 und Wsc3 eine Wsc-Domäne (CRD). Mid2 und Mtl1 tragen diese Domäne nicht, sie besitzen an ihrem N-Terminus einen N-glykosylierten Asparaginrest (nach Kock *et al.*, 2015).

zytoplasmatischen Domäne von Wsc1 zeigte zudem, dass der äußerste C-terminale Bereich essentiell für die Funktion des Sensors ist. In diesem Bereich der Domäne liegt eine Region, die in den sonst sequenziell unterschiedlichen zytoplasmatischen Teilen von Wsc1, Wsc2 und Wsc3, konserviert ist. Es ist eine von zwei konservierten Regionen in der zytoplasmatischen Domäne, beide scheinen für die Funktion von Wsc1 unabdingbar zu sein. Dies wird angenommen, da sich dort Aminosäuren (Y303, L369, V371, N373, D375) befinden, die für die Interaktion von Wsc1 und Rom2 essentiell sind (Vay *et al.*, 2004; Lodder *et al.*, 1999b). Zwischen Aminosäure 317 und 345 von Wsc1 scheint zudem eine Region zu liegen, welche die Funktion von Wsc1 inhibiert und Phosphorylierungsstellen aufweist. Ein Modell für die funktionale Interaktion von Wsc1 und Rom2 besagt, dass eine Phosphorylierung an dieser Stelle eine Interaktion beider Proteine verhindern könnte und demnach über Dephosphorylierung eine Regulation der Stressantwort gegeben sein könnte (Lodder *et al.*, 1999b; Vay *et al.*, 2004).

Es wird außerdem angenommen, dass der zytoplasmatische Teil die Lokalisation und Verteilung der Sensoren in der Zelle bestimmt und so auch einen Einfluss auf die Spezifität der zellulären Stressantwort auf verschiedenen Umwelteinflüsse hat (Straede & Heinisch, 2007b).

Extrazellulärer Teil

Der extrazelluläre Teil der Sensoren, der über eine einzelne Transmembrandomäne mit dem intrazellulären Teil verbunden ist, besteht aus den jeweiligen Kopfgruppen und einer Serin- und Threonin-reichen Domäne (ST-Domäne) und liegt komplett innerhalb der Zellwand, wenn diese eine normale Dicke besitzt (Kock *et al.*, 2015). Diese ST-Domäne zeichnet sich durch eine hohe O-Mannosylierung aus, was für Mid2 und Wsc1 gezeigt wurde (Rajavel *et al.*, 1999). Die O-Mannosylierung ist eine im ER stattfindende Glykosylierung, die in Pilzen, Tieren und Menschen konserviert ist (Loibl & Strahl, 2013). Sie wird von O-Mannosyltransferasen katalysiert, welche in Hefe zur Familie der Pmt-Proteine (Pmt1-7) zusammengefasst werden können. Mutationen dieser Proteine führen zu einem eingeschränkten Wachstum unter normalen, nicht osmotisch stabilen Bedingungen, was ein Hinweis für die Bedeutsamkeit der O-Mannosylierung von Proteinen für die Zellwand-Integrität und -Festigkeit sein kann (Gentsch & Tanner, 1996). Eine O-Mannosylierung kann auch dazu führen, dass Proteine eine starre und verlängerte Konformation annehmen (Jentoft, 1990).

Die O-Mannosylierung von Wsc1 und Mid2 wird durch Pmt2 und Pmt4 durchgeführt und es zeigte sich, dass ein Zelllyse-Defekt einer *pmt2Δ pmt4Δ*-Mutante durch eine Überexpression von *PKC1*, *WSC1* und *MID2* überwunden werden kann (Philip & Levin, 2001; Gentsch & Tanner, 1996; Lommel *et al.*, 2004). Für eine AFM-Vermessung von Wsc1, wurde der Sensor durch eine Mid2-ST-Domäne verlängert und eine 8xHIS-Markierung angefügt. Dadurch ragte der Sensor aus der Zellwand heraus und es war möglich mit Hilfe des „Cantilevers“ des Rasterkraftmikroskops an der HIS-Markierung zu ziehen. Infolgedessen konnten mechanische Eigenschaften des Sensors bestimmt werden. Es zeigte sich, dass diese Eigenschaften einer Nano-, oder „Hookeschen“ Feder zeigte. Dies ließ sich auch für eine Wsc1 Variante feststellen, die nicht verlängert, sondern an einer verdünnten Stelle der Zellwand, wie der Sprossungsnarbe, vermessen wurde.

Zusätzlich wurde in einer *pmt4Δ*-Mutante festgestellt, dass die Mannosylierung der ST-Domäne wichtig für diese mechanische Eigenschaft des Sensors ist (Dupres *et al.*, 2009; Kock *et al.*, 2015). Die Funktion als Nanofeder ist ein Hauptgrund für die Einordnung der Wsc- und Mid-Proteine als Mechanosensoren. Es wird vermutet, dass die Sensoren über ihre jeweilige Kopfgruppe in der Zellwand und über ihre Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert sind. Wirken nun chemische oder mechanische Stresse auf entweder Zellwand oder Membran, so wird die ST-Domäne oder Nanofeder gedehnt oder gestaucht und die Signaltransduktionskaskade kann aktiviert werden (Kock *et al.*, 2015). Unterschiedliche Stresse könnten dabei durch die unterschiedlichen Längen der ST-

Regionen der Proteine von jeweils spezifischen Sensoren detektiert werden (Rodicio & Heinisch, 2010). Jedoch ist dieses Modell experimentell noch nicht bestätigt. Essentiell für dieses Modell ist, dass die Sensoren über ihre jeweilige Kopfgruppe in der Zellwand verankert sind. Für sowohl die CRD der Wsc-Proteine, als auch den N-glykosylierten Asparaginrest der Mid-Proteine wird vermutet, dass sie mit den Glucanen der Zellwand in Kontakt treten könnten (Levin, 2011; Rodicio & Heinisch, 2010).

Wsc- oder Cystein-reiche Domäne (CRD)

Im Unterschied zu den Mid-Sensoren, tragen die Wsc-Proteine eine Kopfgruppe, welche Wsc- oder Cystein-reiche Domäne (CRD) genannt wird. WSC-Domänen oder CRDs finden sich laut den Proteindatenbanken Pfam und SMART nach heutigem Stand in 778 Spezies, die hauptsächlich zu den Pilzen und Tieren gezählt werden. Jedoch können auch Proteine mit CRDs in Bakterien gefunden werden, dabei ist die Domäne in verschiedenste Architekturen von im Moment 2069 bekannten Proteinen aller genannten Spezies eingebaut (Stand April 2019) (El-Gebali *et al.*, 2019; Letunic & Bork, 2018). Im Allgemeinen ist über die Funktion der CRD nicht viel bekannt. CRDs kann man z.B. im humanen Protein Polycystin1 (PKD1) finden. Dieses Protein gilt ebenfalls als Mechanosensor und eine Mutation dieses Membranproteins führt mit der polyzystischen Niere zu einer ernsten Erbkrankheit (Qian *et al.*, 2005). Auch in einem weiteren Protein aus *Homo sapiens*, Kremen1, ist eine CRD vorhanden. Kremen1 ist neben Kremen2 ein wichtiger Ko-Rezeptor des „Dickkopf“-Proteins, welcher ein wichtiger Antagonist des Wnt-Signalweg darstellt. Der Wnt-Signalweg ist mit seinen Genen ein essentieller Regulator der Embryogenese und Zelldifferenzierung in Insekten und Wirbeltieren (Zebisch *et al.*, 2016; Holstein, 2012). Die Struktur von Kremen1 wurde durch Röntgenkristallographie gelöst und eine Kringle-, CUB- und WSC-Domäne identifiziert (Zebisch *et al.*, 2016).

Auch die Struktur der CRD des Sensors Wsc1 aus *S. cerevisiae* konnte 2017 im Rahmen einer Masterarbeit gelöst werden (Schöppner, 2017). Diese zeigte eine hohe Ähnlichkeit im Aufbau zur WSC-Domäne aus Kremen1 (Abbildung 6A). Es wurde gezeigt, dass die Wsc1-CRD eine sehr kompakte Struktur mit einem zentralen β -Faltblatt und einer α -Helix aufweist. Zudem sind acht Cysteine erkennbar, die in den verschiedenen CRDs konserviert sind und Disulfidbrücken bilden. Die Cysteine sind essentiell für die Funktion von Wsc1 und für eine Gruppierung der Wsc1-Sensoren in der Zellmembran. Dies wurde durch Austausch der Cysteine zur Aminosäure Alanin gezeigt (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Es zeigte sich außerdem, dass sich 15 aromatische Aminosäuren in der CRD befinden, von denen 12 an der Oberfläche der Domäne liegen. 11 dieser Aromaten, hauptsächlich Tyrosine, können durch räumliche Nähe innerhalb der Struktur in drei Gruppen unterteilt werden, Gruppe 1 mit Y22, Y24 und Y107, Gruppe 2 mit Y64, Y70 und Y104 und abschließend Gruppe 3 mit Y41, W43, Y89, F91 und Y93 (Abbildung 6C) (Schöppner, 2017). Gruppierte, aromatische Aminosäuren

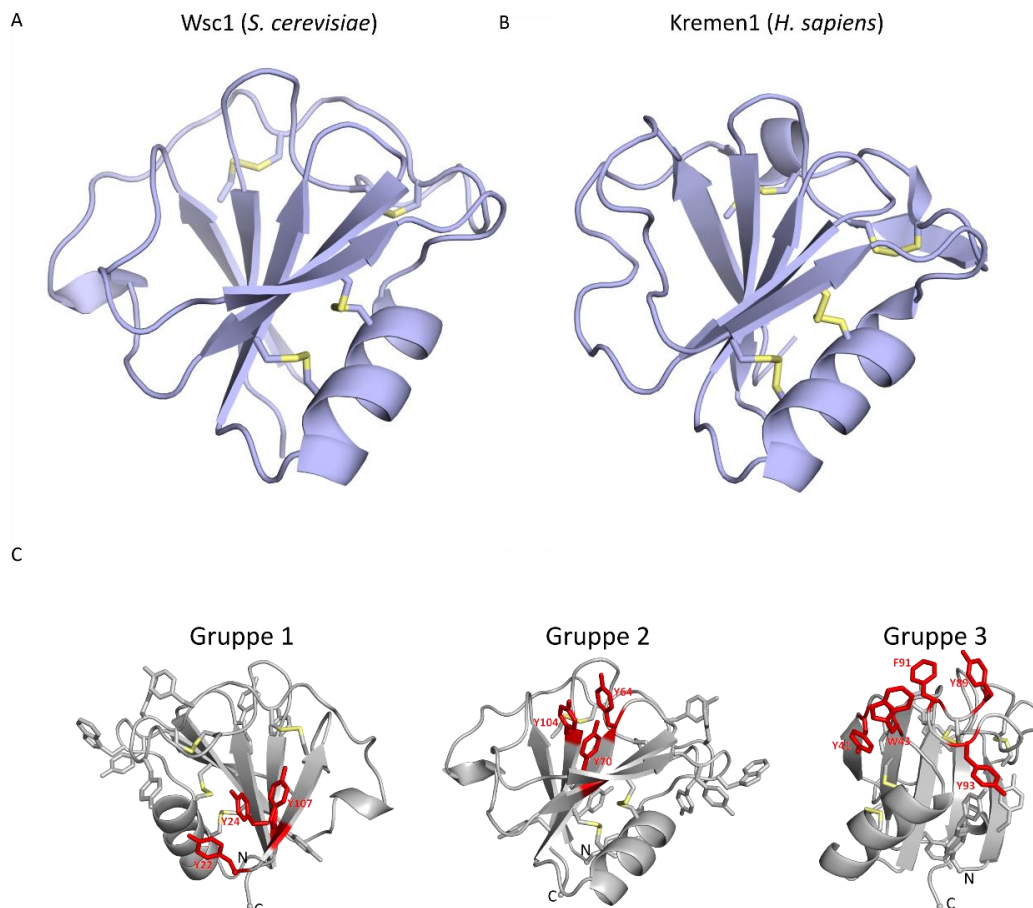


Abbildung 6: Strukturen der WSC-Domäne aus Wsc1 (*S. cerevisiae*) und Kremen1 (*H. sapiens*). Gezeigt sind die Strukturen der CRDs aus Wsc1 (Aminosäure 22-118; A) und Kremen1 (Aminosäure 116-210; B). Beide sind sehr kompakt, tragen ein zentrales β -Faltblatt und eine α -Helix. Es sind acht konservierte Cysteine vorhanden, die Disulfidbrücken bilden (gelb markiert). Strukturabbildungen nach Schöppner, 2017; Zebisch *et al.*, 2016. C: In Rot sind die gruppierten, aromatischen Aminosäuren dargestellt (Gruppe 1 bis 3). Disulfidbrücken sind erneut gelb markiert.

können auch in anderen Zellwandproteinen, wie dem Adhäsin Flo11, beobachtet werden. In Flo11 sollen die gebänderten Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins homotypische Interaktionen vermitteln (Kraushaar *et al.*, 2015). Für die aromatischen Aminosäuregruppen in der CRD ist noch keine Funktion beschrieben worden. Die Frage, ob auch diese an Interaktionen zu anderen Proteinen oder Substraten beteiligt sind, ist noch unbeantwortet.

1.5.2 Funktionelle Untersuchungen der Sensoren

Trotz zahlreicher Untersuchungen der Wsc- und Mid-Sensorfamilie ist die Funktion der einzelnen Proteine und der Grund für die Erhaltung fünf dermaßen ähnlicher Sensoren im Genom nicht geklärt. Wsc1 und Mid2 scheinen die wichtigsten Vertreter der Sensorfamilie zu sein. Dies zeigt sich dadurch, dass eine *wsc1Δ mid2Δ*-Mutante nur in Gegenwart eines osmotischen Stabilisators, wie z.B. Sorbitol, wachsen kann, während eine *wsc2Δ wsc3Δ*-Mutante, wie auch ihre Einzeldelationen, kaum in ihrem Wachstum eingeschränkt ist (Ketela *et al.*, 1999; Verna, James *et al.*, 1997). Durch verschiedenste Analysen von Einzel- und Doppeldelationsstämmen der Sensoren, konnte gezeigt werden, dass sich eine gewisse Spezifität der jeweiligen Sensorfunktionen abzeichnen könnte. Durch eine Deletion von

WSC1 zeigt sich, dass die Mutanten bei leicht erhöhten Temperaturen (37 °C) Wachstumseinschränkungen aufweisen. Dieser Phänotyp kann durch eine Deletion von WSC2 oder WSC3 verstärkt werden (Verna, James *et al.*, 1997). Zudem zeigt eine *wsc1Δ*-Mutante eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber chemischen Komponenten, welche die Zellwand oder Plasmamembran stören, wie z.B. Kongorot, Caspofungin, Calcofluorweiß, Teebaumöl oder Chlorpromazin (Rodicio & Heinisch, 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass Wsc1 auch die Biofilmbildung auf halbfestem Agarmedium, unabhängig vom Adhäsin Flo11, beeinflusst (Sarode *et al.*, 2014).

Eine *mid2Δ*-Mutante zeigt zwar auch Wachstumseinschränkungen, wenn sie Stress durch Kongorot, Calcofluorweiß und Teebaumöl ausgesetzt ist, sie zeigt jedoch auch eine Empfindlichkeit gegenüber Pheromonen (Rajavel *et al.*, 1999; Straede *et al.*, 2007; Levin, 2011). Es ist zudem publiziert, dass Zellwandstress durch Caspofungin hauptsächlich durch Wsc1 erkannt wird, während Mid2 den Einfluss von Kongorot detektiert (Sanz *et al.*, 2017; Levin, 2011). Neben diesen Unterschieden deuten sich zusätzlich überlappende Funktionen insbesondere von Wsc1 und Mid2 an, da es je nach Stress vorkommen kann, dass eine überexprimierte Version des einen Sensors, die Funktion des anderen übernehmen kann (Levin, 2011).

Die Lokalisationen der einzelnen Sensoren können dagegen wiederum auch auf eine spezifische Funktion der Sensoren hinweisen. So zeigt Mid2 während des vegetativen Wachstums eine sehr gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellwand, jedoch ist bei der Paarung („Mating“) zweier Hefezellen eine dem Paarungspartner zugewandte Lokalisation erkennbar (Hutzler *et al.*, 2008; Straede & Heinisch, 2007b). Wsc1 dagegen lokalisiert zwar auch in der Zellwand, jedoch nicht gleichmäßig, sondern oft punktförmig und an Stellen des polarisierten Zellwachstums. Außerdem findet sich zudem eine große Menge Wsc1-Protein im Zellinneren (Straede & Heinisch, 2007b). Die Lokalisierung von Wsc1 im Zellinneren lässt sich durch ein Endozytosesignal (NPF_{X(1,2)}D) erklären, das für das Recycling des Sensors verantwortlich ist. Ohne das Signal, oder in Endozytose-defizienten Mutanten, zeigen Hefen eine gleichmäßig in der Zellwand verteilte Lokalisation von Wsc1, Wachstumseinschränkungen und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Caspofungin. Dies zeigt die Wichtigkeit der ungleichmäßigen Lokalisation von Wsc1 und des Recyclings des Sensors (Piao *et al.*, 2007; Dupres *et al.*, 2009; Wilk *et al.*, 2010). Es wurde zudem gezeigt, dass Wsc1 bei Stress gebündelt in der Zellwand vorhanden ist und dies von der CRD und den konservierten Cysteinen dieser Domäne abhängig ist (Heinisch, Dupres & Alsteens *et al.*, 2010). Für Wsc2 wurde eine Wsc1-ähnliche Lokalisation publiziert, wobei das Recycling dieses Sensors von einem anderen Endozytosesignal abhängt (K495). Dabei wurde auch festgestellt, dass Wsc2 zur allgemeinen Wachstumsfitness von Hefen unter Laborbedingungen beiträgt (Wilk *et al.*, 2010).

Die Frage nach der Spezifität der stress- und mechanosensitiven Funktion der einzelnen Sensoren bleibt, trotz zahlreicher Informationen über die Sensoren, endgültig zu klären. Ebenfalls ungeklärt ist,

ob die Sensoren in verschiedenen Hefestammhintergründen die gleiche Aufgabe übernehmen. Dies müsste zum einen durch weitere Untersuchungen in verschiedenen Stammhintergründen von *S. cerevisiae* analysiert werden. Zum anderen würden Untersuchungen in Hefestämmen, in denen z.B. nur noch einer der Sensoren vorhanden ist, neue Möglichkeiten bieten, die Funktion einzelner Sensoren zu analysieren.

1.6 Zielsetzung

Zu den potentiellen Mechanosensoren der Wsc- und Mid-Familie gibt es eine Vielzahl von Informationen und Publikationen. Allerdings sind bis heute viele Aspekte ungeklärt und die Informationen über die Sensoren in der Literatur oftmals uneindeutig oder widersprüchlich. So ist z.B. unbekannt, warum die Hefe *S. cerevisiae* fünf dieser Sensoren trägt, die sich in ihrem Aufbau stark ähneln. Deshalb sollten in dieser Arbeit Mutanten hergestellt werden, die nur noch einen oder keinen dieser Sensoren tragen, um zu analysieren, ob den verschiedenen Proteinen spezifische Funktionen zugeordnet werden können. Dabei sollten die Funktionen der Sensoren unter anderem bei Stresseinwirkungen, die den Zellwandintegritäts-Signalweg aktivieren, untersucht werden.

Weiterhin ungeklärt ist, ob es sich bei den Wsc- oder Mid-Sensoren um Mechanosensoren handelt, die Kontakt zu Oberflächen wahrnehmen können. Es sollten ebenfalls mit Hilfe von Einzelsensor-Stämmen Oberflächenkontakt-abhängige Phänotypen, wie Biofilm- oder Pseudohyphenbildung untersucht werden, um so einen Hinweis auf die eventuellen mechanosensitive Funktion der einzelnen Sensoren zu bekommen. Daher sollten diese phänotypischen Untersuchungen der Einzelsensor-Expressionsmutanten im *S. cerevisiae*-Stammhintergrund $\Sigma 1278b$ stattfinden. Dies ermöglichte auch Informationen darüber zu sammeln, ob die Sensoren in verschiedenen Stammhintergründen vergleichbare Funktionen übernehmen.

Auch über die genau Struktur-Funktions-Beziehung der Wsc- oder Cystein-reichen Domäne ist nur sehr wenig bekannt. Durch die röntgenkristallografische Lösung der CRD-Struktur aus Wsc1 konnte im Vorfeld festgestellt werden, dass sich 12 aromatische Aminosäuren an exponierten Stellen der Domäne befinden. In dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob diese Aminosäuren, ähnlich den konservierten Cysteinen der Domäne, essentiell für die Sensorfunktion sind.

2 Ergebnisse

2.1 Systematische funktionelle Analyse der Wsc-/Mid-Sensorfamilie

2.1.1 Herstellung von Hefestämmen zur Analyse der Funktion, Expression, Lokalisation und Stabilität einzelner Sensoren

In den meisten bisherigen Arbeiten zur Untersuchung des CWI-Signalweges und der Wsc1-/Mid-Sensoren wurden funktionelle Analysen anhand von Einzel- oder Doppeldeletionen der Sensoren in *S. cerevisiae*-Stämmen des genetischen Stammhintergrunds S288C durchgeführt. Dies ermöglicht jedoch nicht, bestimmte Phänotypen, die in Zusammenhang mit Wahrnehmung von Oberflächen stehen, wie z.B. adhäsives Wachstum oder Pseudohyphenbildung, zu untersuchen, da Stämme des S288C-Stammhintergrunds zu diesen nicht in der Lage sind (Liu *et al.*, 1996). In dieser Arbeit sollten deshalb entsprechend *S. cerevisiae*-Mutanten im Stammhintergrund Σ 1278b hergestellt werden, da in diesen sowohl stressbedingte, als auch oberflächenabhängige Phänotypen untersucht werden können. Es sollte dabei nicht nur mit Einzel- oder Doppeldeletions-Mutanten gearbeitet werden, sondern mit Stämmen, in denen jeweils nur noch einer der potentiellen Mechanosensoren Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 oder Mtl1 vorhanden ist. Dies sollte z.B. die Klärung erleichtern, welche spezifischen Aufgaben die einzelnen Sensoren in der Zelle innehaben, da nicht im Detail geklärt ist, warum sich fünf dieser ähnlichen Sensoren in *S. cerevisiae* befinden. Ausgehend von den beiden haploiden Ausgangsstämmen YHUM0476 (*MATa*) und YHUM0477 (*MAT α*) wurden insgesamt sechs verschiedene Sets von Mutantenstämmen hergestellt, um die Funktion der einzelnen Sensoren beim Zellwachstum, sowie der Expression, Lokalisation und Stabilität zu untersuchen. In einem weiteren Schritt wurden diese Stämme verwendet, um die Rolle der einzelnen Sensoren bei der Aktivierung des CWI-Signalweges, sowie ihren Effekt auf die Zellwandzusammensetzung und Stressvermittlung zu ermitteln.

Set1: Analyse des Zellwachstums

Als erstes Set wurden Hefestämme hergestellt, welche nur noch einen einzelnen Sensor unter der Kontrolle des nativen Promotors oder keinen der CWI-Sensoren tragen. Hierzu wurden in den Ausgangsstämmen YHUM0476 (*MATa*) und YHUM0477 (*MAT α*) Einzeldelationen durch homologe Rekombination eingeführt (Janke *et al.*, 2004). *WSC1* wurde dabei durch ein *URA3*-Gen, *WSC2* durch *HIS3*, *WSC3* durch *LEU2*, *MID2* durch ein G418- und *MTL1* durch ein Hygromycin-Resistenzgen (aus pKS134 und pKS133) jeweils in den beiden Ausgangsstämmen ersetzt. Anschließend wurden die Stämme in verschiedenen Kombinationen gekreuzt und die dabei entstandenen Diploiden zur Sporulation gebracht. Danach wurden durch eine Tetradendisektion haploide Stämme hergestellt und diejenigen Stämme selektiert, welche mehrere Deletionen verschiedener *WSC*- oder *MID*-Gene enthielten (Abbildung 7A). Die Selektion der gewünschten Stämme erfolgte zunächst durch

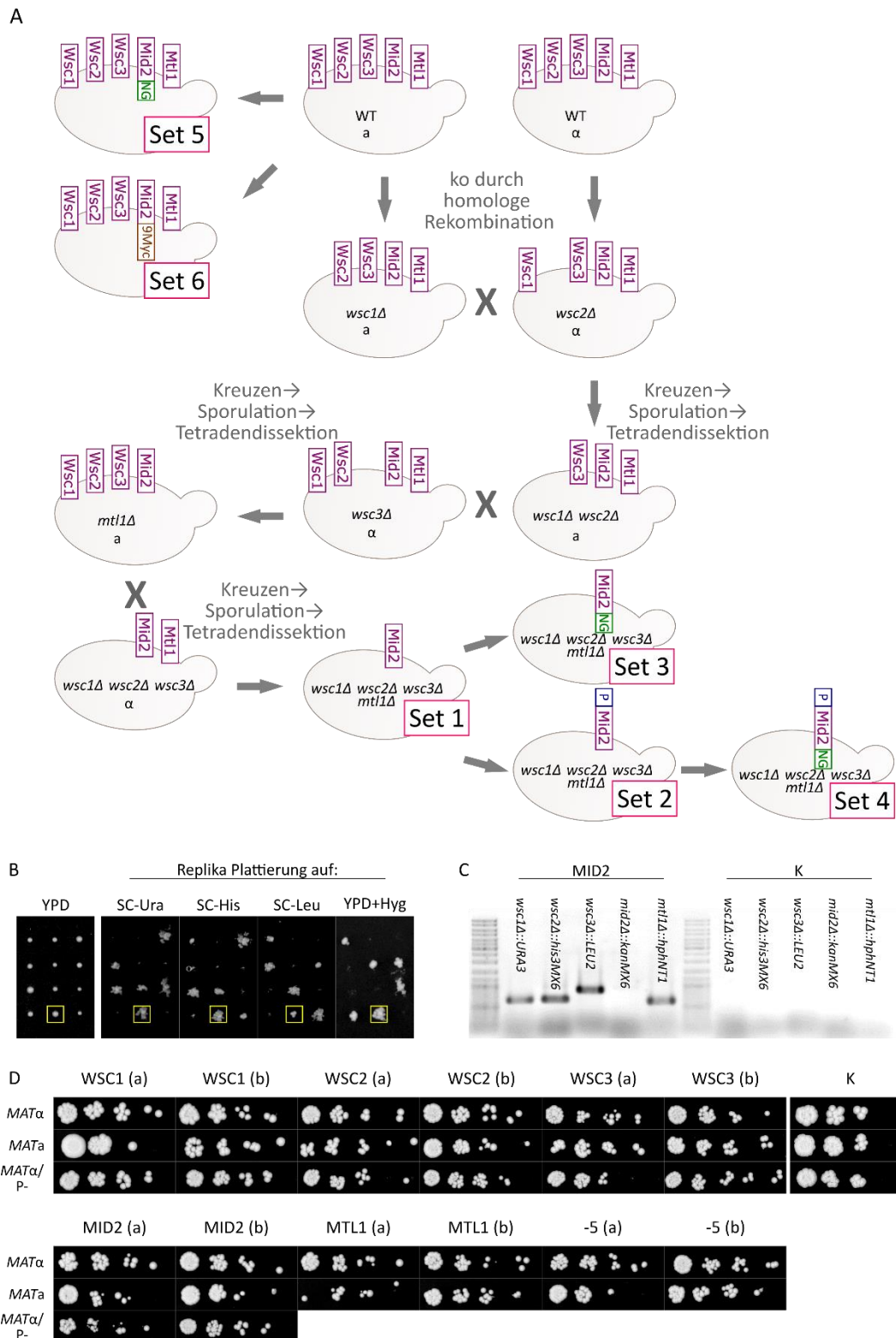


Abbildung 7: Stammherstellung und Wachstumstest der Wsc- und Mid-Mutanten. A: Schema der Stammherstellung. Stämme mit Einzeldeletionen verschiedener Geschlechtstypen wurden zunächst gekreuzt. Die so entstandenen Diploiden wurden zur Sporulation gebracht und durch Tetraden-dissektion die gewünschten haploiden Mutanten hergestellt. Es wurden verschiedene Stammsätze hergestellt. Set1: Einzel-Sensormutante; Set2: Set1 mit *ADH*-Promotor; Set3: Set1 mit eingefügter mNeongreen (NG)-Markierung einzelner Sensoren; Set4: Set2 mit NG-Markierung einzelner Sensoren; Set5: Wildtyp-Stamm (WT) mit NG-Markierung einzelner Sensoren; Set6: WT-Stamm mit 9myc Markierung einzelner Sensoren (siehe Tabelle 1). B: Beispiel einer Stammsselektion nach der Tetraden-dissektion (Bsp. für einen MID2-Stamm). Die zunächst auf YPD gewachsenen Sporen wurden auf die verschiedenen Selektionsplatten replika-plattiert und anhand der eingesetzten Selektionsmarker wurde der Stamm mit dem gewünschten Genotyp identifiziert. C: Beispiel einer Test-PCR zur Verifizierung der vorhandenen Selektionskassetten der Knock-outs (hier für einen MID2-Stamm [YHUM2789]). K=YHUM0463. D: Das Wachstum der in dieser Arbeit hergestellten Stämme wurde durch einen Tropftest mit Verdünnungsreihe (1/5) auf YPD-Medium überprüft. Es wurden je zwei Klone für jede hergestellte Mutante getestet. MATα=Set1; MATa=YHUM2893-2899, YHUM2785,2788,2790,2791; MATα/P-=Set2; K=YHUM0462 (MATa) oder K=YHUM0463 (MATα).

Replikaplattierung auf entsprechendem Selektionsmedien (Abbildung 7B). Anschließend wurden die Stämme, welche für spätere Experimente genutzt werden sollten, durch eine Test-PCR verifiziert (Abbildung 7C). Dieser Ablauf wurde wiederholt, bis Mutanten entstanden, die nur noch jeweils ein oder kein aktives *WSC*- oder *MID*-Gen besaßen. Diese werden im Folgenden als WSC1, WSC2, WSC3, MID2, MTL1 und -5 bezeichnet (Tabelle 1). Die so entstandenen Mutanten aus Set1 wurden dann durch einen seriellen Tropftest auf YPD-Medium auf ihr Wachstum überprüft. Es war festzustellen, dass alle hergestellten Mutanten in der Lage waren, auf YPD zu wachsen. Es waren lediglich kleine Unterschiede in den Koloniegrößen zu erkennen, beispielsweise zeigte der WSC3- oder MTL1-Stamm ein etwas weniger ausgeprägtes Wachstumsverhalten, als die Kontrolle (Abbildung 7D). Dies bedeutet, dass in Stämmen des genetischen Stammhintergrundes $\Sigma 1278b$ die Wsc- und Mid-Sensoren nicht essentiell für das Wachstum ohne Stresseinfluss sind.

Set2: Promotoraustausch und Analyse des Zellwachstums

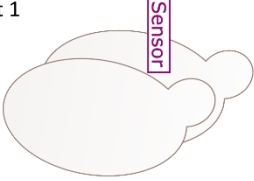
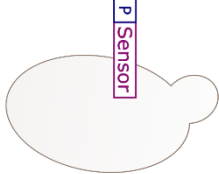
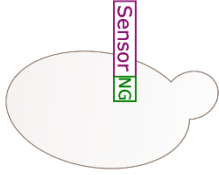
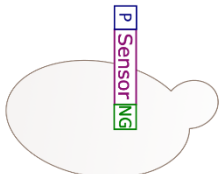
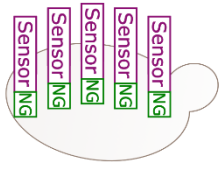
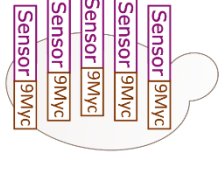
Aus einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Masterarbeit war bekannt, dass die verschiedenen Wsc- und Mid-Proteine in sehr unterschiedlichen Mengen in Zellen des Hefestammhintergrundes $\Sigma 1278b$ vorhanden sind (Gesa Schmitz, 2016). Im Vergleich zu Wsc1 (100 %) sind Wsc2 (ca. 40 %), Wsc3 (ca. 20 %) und Mtl1 (< 5 %) deutlich weniger präsent. Mid2 (ca. 120 %) weist dagegen eine höhere Proteinmenge im Vergleich zu Wsc1 auf.

Um die Möglichkeit zu haben, die verschiedenen Sensoren hinsichtlich ihrer Funktion besser vergleichen zu können, wurde ein zweites Stammset (Set2) hergestellt, in dem der natürliche Promotor der einzelnen Gene durch homologe Rekombination durch einen *ADH*-Promotor (aus pYM-N7) ersetzt wurde (Janke *et al.*, 2004). Die zu erwartende Expression durch diesen Promotor sollte der des *MID2*-Promotors gleichen. Damit sollte erreicht werden, dass die jeweiligen Proteinmengen der einzeln exprimierten Sensoren in den entsprechenden Mutanten vergleichbarer sind. Nach ihrer Herstellung wurde das Wachstum der Set2-Stämme ebenfalls mit Hilfe eines Tropftests überprüft. Es war zu erkennen, dass die Mutanten mit *ADH*-Promotor ebenfalls normales Wachstum auf YPD aufwiesen (Abbildung 7D). Damit konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Promotoren keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme auf Vollmedium hat.

Set3, Set4, Set5: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation und Proteinmenge

Um die Proteinmengen und die Lokalisation der einzelnen Sensoren zu bestimmen, wurden in einem nächsten Schritt in den Stämmen der Stammsets 1 und 2 und in Stämmen, in denen alle Sensoren

Tabelle 1: Übersicht der hergestellten Stammsets. Detaillierte Stammbeschreibungen sind in Tabelle 14 einzusehen.

Set	In dieser Arbeit verwendete Bezeichnung	Stammname
Set 1 	WSC1 (a/b)	YHUM2901/YHUM2902
	WSC2 (a/b)	YHUM2903/YHUM2904
	WSC3 (a/b)	YHUM2905/YHUM2906
	MID2 (a/b)	YHUM2789/YHUM2792
	MTL1 (a/b)	YHUM2786/YHUM2787
	-5 (a/b)	YHUM2822/YHUM2823
Set 2 	P-WSC1 (a/b)	YHUM2907/YHUM2908
	P-WSC2 (a/b)	YHUM2909/YHUM2910
	P-WSC3 (a/b)	YHUM2911/YHUM2912
	P-MID2 (a/b)	YHUM2764/YHUM2765
Set 3 	WSC1-NG (a/b)	YHUM2915/YHUM2916
	WSC2-NG (a/b)	YHUM2917/YHUM2918
	WSC3-NG (a/b)	YHUM2919/YHUM2920
	MID2-NG (a/b)	YHUM2921/YHUM2922
	MTL1-NG (a/b)	YHUM2923/YHUM2924
Set 4 	P-WSC1-NG (a/b)	YHUM2925/YHUM2926
	P-WSC2-NG (a/b)	YHUM2927/YHUM2928
	P-WSC3-NG (a/b)	YHUM2929/YHUM2930
	P-MID2-NG (a/b)	YHUM2931/YHUM2932
Set 5 	K+WSC1-NG (a/b)	YHUM2933/YHUM2934
	K+WSC2-NG (a/b)	YHUM2935/YHUM2936
	K+WSC3-NG (a/b)	YHUM2937/YHUM2938
	K+MID2-NG (a/b)	YHUM2939/YHUM2940
	K+MTL1-NG (a/b)	YHUM2941/YHUM2942
Set 6 	Wsc1-9Myc (a/b)	YHUM2635/YHUM2636
	Wsc2-9Myc (a/b)	YHUM2600/YHUM2601
	Wsc3-9Myc (a/b)	YHUM2604/YHUM2605
	Mid2-9Myc (a/b)	YHUM2602/YHUM2603
	Mtl1-9Myc (a/b/c/d)	YHUM2607/YHUM2617/YHUM2618/YHUM2658
WT	K (MAT α) K (MATa)	YHUM0463 YHUM0462

exprimiert wurden, die einzelnen Sensorgene mit einer *mNEONGREEN*- Markierung versehen. Hierbei war es leider nicht möglich, das *MTL1*-Gen mit *ADH*-Promotor im hergestellten Stamm des Sets 2 mit

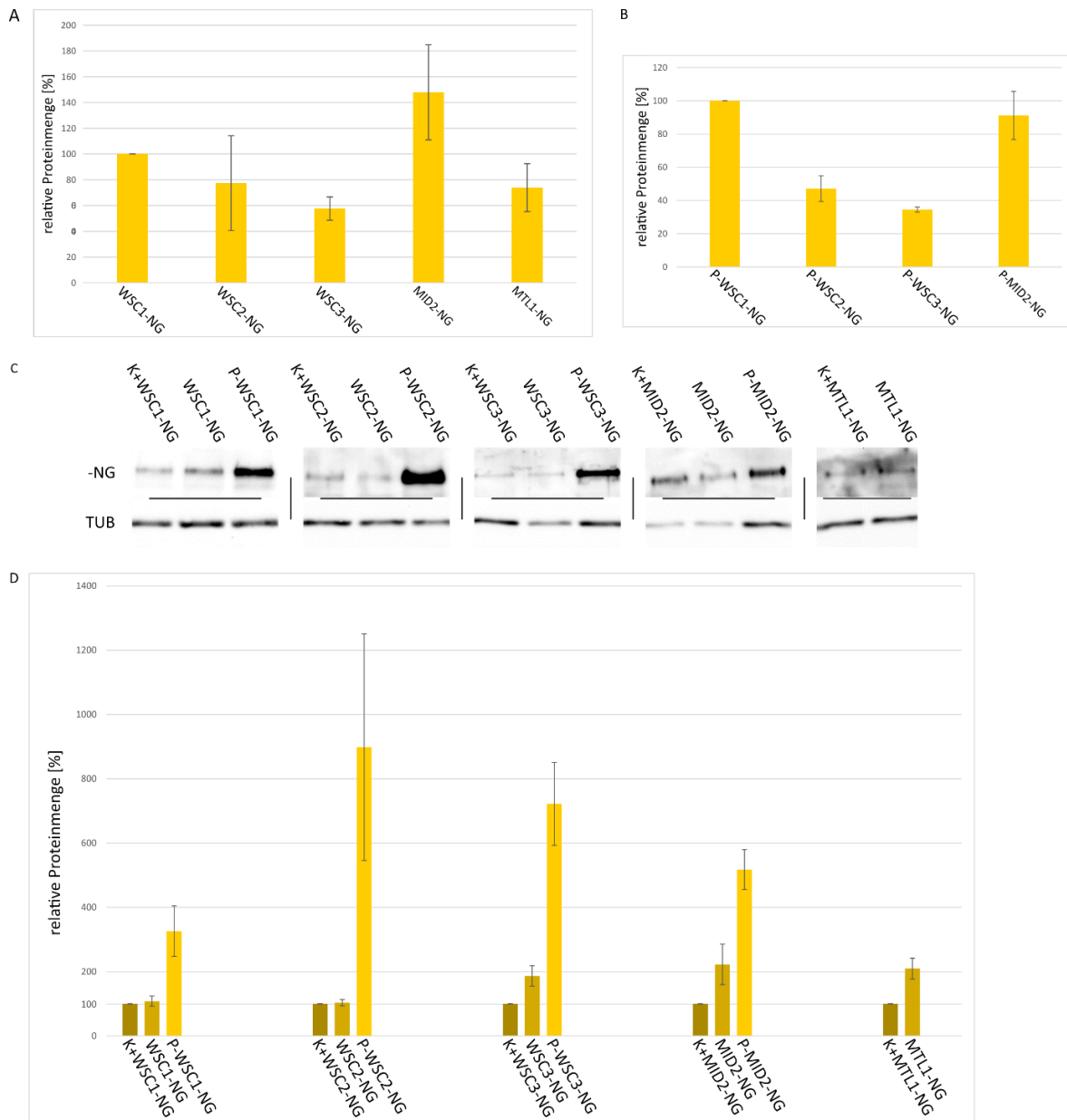


Abbildung 9: Menge der mNeongreen-Fusionsproteine. Die Stämme wurden in YPD-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen und anschließend Proteine aus der Menge Zellen, welche 1 OD₆₀₀ entsprachen, präpariert. Es wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt und zur Detektion der Proteine ein mNeongreen-Antikörper und als Ladekontrolle ein Anti-Tubulin Antikörper verwendet. A: Quantifizierung der Western Blot Analyse der Stämme aus Set3. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Experimente mit je zwei Klonen ausgewertet. Die Menge an Fusionsprotein wurde auf die Menge des Tubulins normalisiert. Die Menge an Fusionsprotein des WSC1-NG Stammes wurde auf 100 % gesetzt, die Menge der Proteine in den Mutanten ist jeweils relativ dazu dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. B: Quantifizierung der Western Blot Analyse der Stämme aus Set4. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Experimente mit je zwei Klonen ausgewertet. Die Menge an Fusionsprotein wurde auf die Menge des Tubulins normalisiert. Die Menge an Fusionsprotein des P-WSC1-NG Stammes wurde auf 100 % gesetzt, die Menge der Proteine in den Mutanten ist jeweils relativ dazu dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. C: Beispieldarstellung des Western Blotes zu D. D: Quantifizierung der Western Blot Analyse. Zur Quantifizierung wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet. Die Menge an Fusionsprotein wurde auf die Menge des Tubulins normalisiert. Die Menge an Fusionsprotein der jeweiligen Kontrolle (Set5) zu den einzelnen Proteinen wurde auf 100 % gesetzt, die Menge der Proteine in den Mutanten (Set3 und Set4) ist jeweils relativ dazu dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler

beeinflussen und dass der Promotor ebenfalls keinen Einfluss auf die jeweilige untersuchte Lokalisation hatte.

Die Menge der Sensorproteine der Stammsets 3, 4 und 5 wurde anschließend durch eine Western Blot Analyse bestimmt. Zunächst sollte dabei geprüft werden, ob die Proteinmengen der Sensoren aus Set4 durch Einführung des einheitlichen *ADH*-Promotors vergleichbar waren. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Proteinmenge zwischen den einzelnen Stämmen des Stammsets 4 deutliche Unterschiede aufwies (Abbildung 9B). Die Menge an Fusionsprotein im P-WSC2-NG Stamm war im Vergleich zur Menge im P-WSC1-NG Stamm weniger als die Hälfte. Dies war ebenso bei P-WSC3-NG der Fall, während zu erkennen war, dass die Menge an Mid2-Fusionsprotein im P-MID2-NG Stamm relativ zum Wsc1-Fusionsprotein nur leicht reduziert war. Verglich man die Mengen der Sensoren in den Set3-Stämmen, so konnte festgestellt werden, dass sich auch hier die Mengen in einer vergleichbaren Weise ändern. Relativ zu der Wsc1-Menge, zeigten Wsc2, Wsc3 und Mtl1 eine verringerte Proteinmenge (60 % - 80 %). Für Mid2 konnte eine höhere Proteinmenge im Vergleich zu Wsc1 gemessen werden (140 %). Das Verhältnis der Proteinmengen unterscheidet sich damit leicht von dem Mengenverhältnis der Sensoren, in Anwesenheit der anderen Sensoren, welches in einer im Vorfeld angefertigten Masterarbeit festgestellt wurde (Abbildung 9A) (Schmitz, 2016). Dort waren die Mengen von Wsc2, Wsc3 und Mtl1 relativ zu Wsc1 geringer.

Deshalb sollten in einem nächsten Schritt die Mengen der Sensoren der Stammsets 3, 4 und 5 verglichen werden, sodass die für jeden Sensor der Einfluss der Ab- und Anwesenheit der anderen Sensoren und des *ADH*-Promotors bestimmt werden konnte. Dabei war zu erkennen, dass sich die Menge von WSC1-NG und WSC2-NG mit der der jeweiligen Kontrollstämmen (K+WSC1-NG und K+WSC2-NG aus Set5) vergleichen ließ. Die Varianten mit ausgetauschten Promotoren waren in beiden Fällen stärker in der Zelle vorhanden. Die Wsc1 Menge lag ca. bei 300 % im Vergleich zur Kontrolle, die Menge von Wsc2 bei ca. 800 %. Im Falle der Stämme mit aktivem Wsc3-, Mid2- und Mtl1-Sensoren war deutlich wahrzunehmen, dass die Menge der Fusionsproteine bereits in den Stämmen mit nativem Promotor im Vergleich zum jeweiligen Stamm aus Set5 erhöht war. Sie lag bei allen Proteinen relativ bei 200 %. Die Proteinmenge von P-WSC3-NG lag erhöht bei ca. 650 % und die von P-MID2-NG bei 450 % im Vergleich zu K+WSC3-NG und K-MID2-NG, die in allen Fällen zur Quantifizierung auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 9D).

Dies bedeutet zum einen, dass der *ADH*-Promotor zwar eine Steigerung der Proteinmenge in allen untersuchten Stämmen erhöht hat, dies aber nicht zu einer Angleichung der unterschiedlichen Sensormengen führte. Das heißt, dass hier eine post-transkriptionelle und -translationale Beeinflussung der Sensoren stattfinden muss. Zudem wurde deutlich, dass die Abwesenheit der

anderen Sensoren einen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine hat. Dies könnte z.B. auf eine gegenseitige Einflussnahme der Sensoren hindeuten.

Set6: Analyse der Proteinstabilität

In einem weiteren Schritt sollte die Stabilität der Sensoren in der Zelle bestimmt werden. Dies sollte durch den Translationshemmer Cycloheximid erreicht werden. Dieser stoppt in lebenden Hefezellen die Proteinbiosynthese, um so die Stabilität vorhandener Proteine zu untersuchen (Belle *et al.*, 2006). Hierfür wurden in einer vorherigen Arbeit Stämme hergestellt, in denen die verschiedenen Wsc- und Mid-Proteine in Anwesenheit aller weiteren Sensoren je mit einer neunfachen Myc-Markierung (9Myc) versehen wurden (Schmitz, 2016) (Set6). Die Stämme des Sets6 wurden in YPD bis zur exponentiellen Phase angezogen, woraufhin zunächst vor Cycloheximid Zugabe (0 Stunden) und anschließend stündlich bis 3 Stunden nach Zugabe des Cycloheximids Proben zur Proteinextraktion entnommen wurden. Auf den Membranen des Western Blots ist zu erkennen, dass die verschiedenen Sensoren nicht als eine Bande auf der Membran zu sehen waren, sondern ausnahmslos ein Bandenmuster aufwiesen, wie es schon in einer Masterarbeit bei diesen Stämmen aufgefallen war (Schmitz, 2016) (Abbildung 10A).

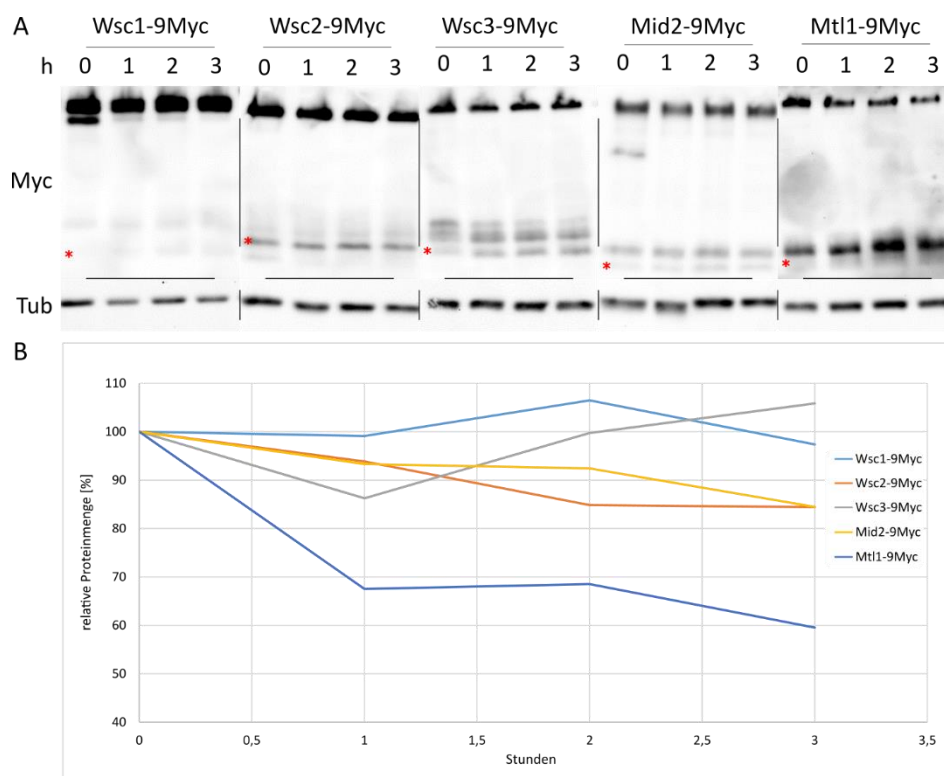


Abbildung 10: Analyse der Proteinstabilität. Die Stabilität der Proteine wurde mit Hilfe von Cycloheximid bestimmt. Die Stämme, in denen die einzelnen Proteine mit einer 9Myc-Markierung versehen waren, wurden in YPD-Medium angezogen. Es wurden zur Proteinextraktion vor Zugabe von 200 µg/ml Cycloheximid (0 h) und zu den angegebenen Zeitpunkten (1 h, 2 h und 3 h) Zellen entnommen (1 OD₆₀₀) und eine Western Blot Analyse durchgeführt. A: Beispielhafte Western Blots. Die roten Sterne markieren die Höhe der zu erwartenden Bande des jeweiligen unmodifizierten Proteins: Wsc1: 39 kD, Wsc2: 52 kD, Wsc3: 58 kD, Mid2: 39 kD, Mtl1: 58 kD. B: Quantifizierung der Western Blots. Für die Proteinextraktion und die Western Blots wurden zwei Klone der jeweiligen Myc-markierten Mutante verwendet und zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Für die Berechnung wurde das Myc-Signal mit Hilfe des Tubulin-Signals normalisiert und der

Dies weist auf eine posttranslationale Modifikation, wie Phosphorylierung oder Glykosylierung hin. Bei

Wsc1-9Myc war zu erkennen, dass sich das Bandenmuster im Laufe der Zeit veränderte. Dabei wurde die obere Doppelbande undeutlicher, während andere Banden dazukamen. Auch bei den anderen Stämmen war eine Veränderung des Musters auszumachen. Dies war sehr eindeutig bei z. B. Mid2-9Myc festzustellen, wo ebenfalls eine Bande nach Stunde 1 verschwunden war. Eine Quantifizierung der Signale ergab, dass Wsc1-9Myc und Wsc3-9Myc eine sehr hohe Stabilität aufwiesen, die Proteinmenge blieb bis auf kleine Schwankungen auf demselben Wert, wie vor der Zugabe des Cycloheximids. Wsc2-9Myc und Mid2-9Myc waren etwas instabiler, die Menge an Protein nahm nach 3 Stunden auf ca. 85 % im Vergleich zu 0 Stunden ab. MTL1-9Myc wies eine höhere Instabilität auf. Die Proteinmenge nahm kontinuierlich auf 60 % der Startmenge von Mtl1-9Myc ab (Abbildung 10B). Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die jeweiligen Sensoren unter Normalbedingungen über einen Zeitraum von 3 Stunden in annähernd gleichbleibender Menge in den Zellen vorhanden sind und ein Gleichgewicht zwischen der Herstellung und dem Abbau der Proteine herrscht.

2.1.2 Untersuchung der Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges

Die Wsc- und Mid-Proteine sind in der Zelle als Sensoren an der Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges (CWI) beteiligt. Dieser wird hauptsächlich bei spezifischen Zellwandstressoren aktiviert, er weist allerdings auch eine basale Aktivität in Umgebungen ohne Stresseinwirkung auf (Dichtl *et al.*, 2016). Eine Aktivität des CWI kann durch eine Analyse der Phosphorylierung der CWI-Kinase Slt2 nachgewiesen werden (Levin, 2011). Die Untersuchung der Slt2-Phosphorylierung wird mittels einer Western Blot Analyse durchgeführt. Die Stämme aus Set 1 wurden dafür in YPD angezogen und wuchsen bis zum Erreichen der logarithmischen Phase. Anschließend wurden Proteine aus diesen Kulturen extrahiert und ein SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die Phosphorylierung von Slt2 wurde durch einen speziellen Antikörper (anti-Phospho-p44/42 MAPK [Erk1/2] [Thr202/Tyr204]) dargestellt, dessen ursprüngliche Funktion die Erkennung der humanen Kinasen ERK1 und ERK2 ist, wenn diese an bestimmten Threoninen oder Tyrosinen phosphoryliert werden. Dieser Antikörper erkennt aber ebenfalls die phosphorylierte Form von Slt2 (Slt2-P). Für die Auswertung wurden die Membranen außerdem mit einem Antikörper inkubiert, welcher die unmodifizierte Version von Slt2 (Slt2) sichtbar macht (anti-Mpk1). Als Ladekontrolle wurde ein Anti-Tubulin Antikörper verwendet.

Die Menge an unmodifiziertem Slt2 glich im Stamm -5 der Menge im Kontrollstamm, was auch für den Stamm MTL1 zu beobachten war. Die Slt2-Menge nahm in den Stämmen WSC2, WSC3 und MID2

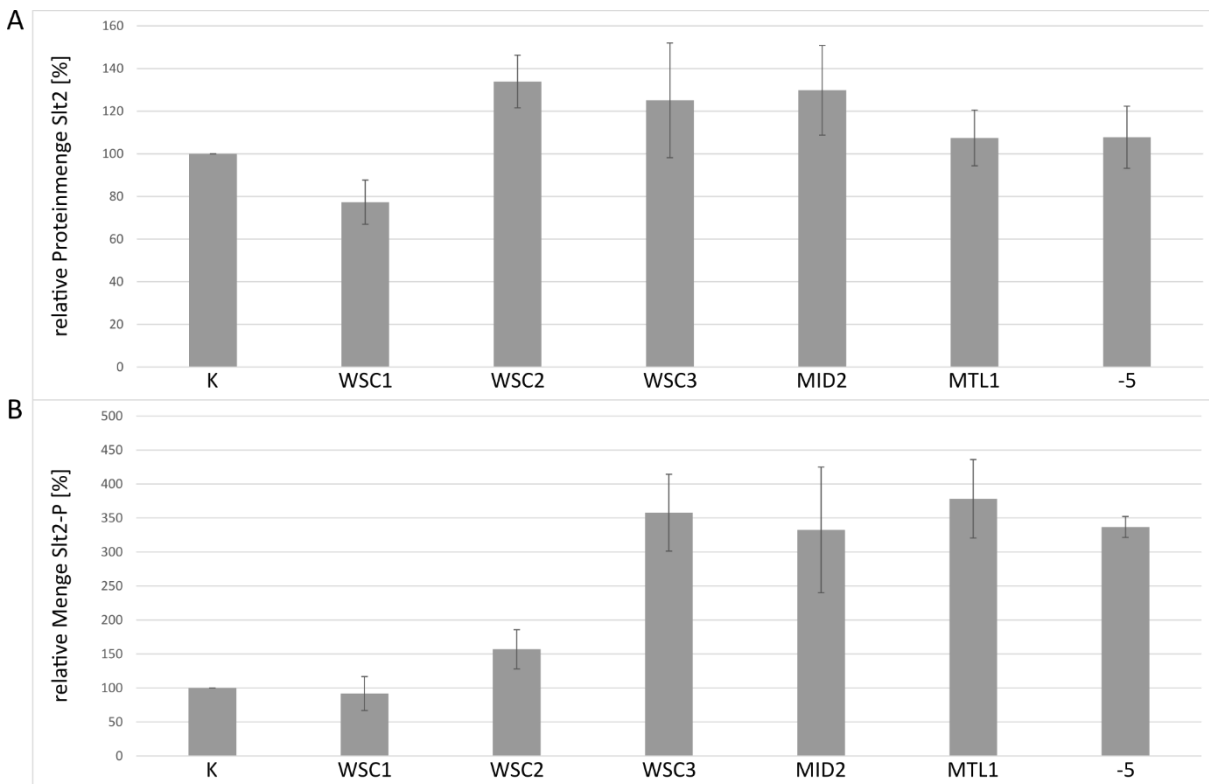


Abbildung 11: Menge an Slt2 und Slt2-P in YPD. Die verwendeten Set1-Stämme wurden bis zur logarithmischen Phase in YPD angezogen und anschließend die Proteine extrahiert. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti Phospho-p44/42 MAP Kinase-Antikörper detektiert. Außerdem wurde ein Tubulin-Antikörper als Ladekontrolle verwendet. K=YHUM0463. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. A: Es ist die Menge an Slt2 dargestellt, welche mit dem Tubulin- Signal normalisiert wurde. Die Menge an Slt2 im Kontrollstamm wurde auf 100 % gesetzt und die Mengen in den jeweiligen Mutanten relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. B: Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und die Menge in den verschiedenen Mutanten ist jeweils relativ dazu berechnet.

dagegen leicht zu (120 %), während die Menge im WSC1-Stamm im Gegensatz zum Kontrollstamm abnahm (80 %; Abbildung 11A).

Bei der Untersuchung des Anteils von phosphoryliertem Slt2 konnten größere Unterschiede festgestellt werden.

Im Stamm ohne Wsc- oder Mid-Proteine konnte eine deutliche Zunahme auf das 3,5-fache der Slt2-P Menge im Vergleich zum Kontrollstamm festgestellt werden. Dies war ebenso in den Stämmen WSC3, MID2 und MTL1 festzustellen. Die Menge an Slt2-P im WSC1-Stamm dagegen war vergleichbar mit der des Kontrollstammes, der WSC2-Stamm zeigte eine leichte Erhöhung (auf 150 %) (Abbildung 11B).

Somit konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit anderer Sensoren oder aller Sensoren, mit Ausnahme des WSC1- und WSC2-Stammes, eine verstärkte Aktivierung des CWI vorlag, obwohl kein spezifischer Stress auf die Zellen einwirkte oder die generelle Menge an Slt2 stark erhöht war.

2.1.3 Untersuchung der Zellwandzusammensetzung

Der CWI beeinflusst bei Zellwandstress unter anderen die Zusammensetzung der Zellwand (Levin, 2011). Mit Hilfe der hergestellten Stammsets 1 und 2 sollte nun der Zellwandaufbau bezüglich des

Glucan- und Chitingehalte untersucht werden. Dies sollte zum einen durch Anfärben des β -1,3-Glucans durch Anilinblau festgestellt werden. Anilinblau ist ein ungiftiger Farbstoff, der an β -1,3-Glucan bindet und so gebunden fluoreszierende Eigenschaften besitzt (Wood & Fulcher; Evans *et al.*; Okada *et al.*, 2010). Eine weitere Möglichkeit, die Zellwand von *S. cerevisiae* anzufärben, bietet der Farbstoff Trypanblau. Es wurde gezeigt, dass der rot fluoreszierende Farbstoff sich an der Zellwand anlagert und das Färbemuster dem von Calcofluorweiß, welches Chitin anfärbt, gleicht (Liesche *et al.*, 2015).

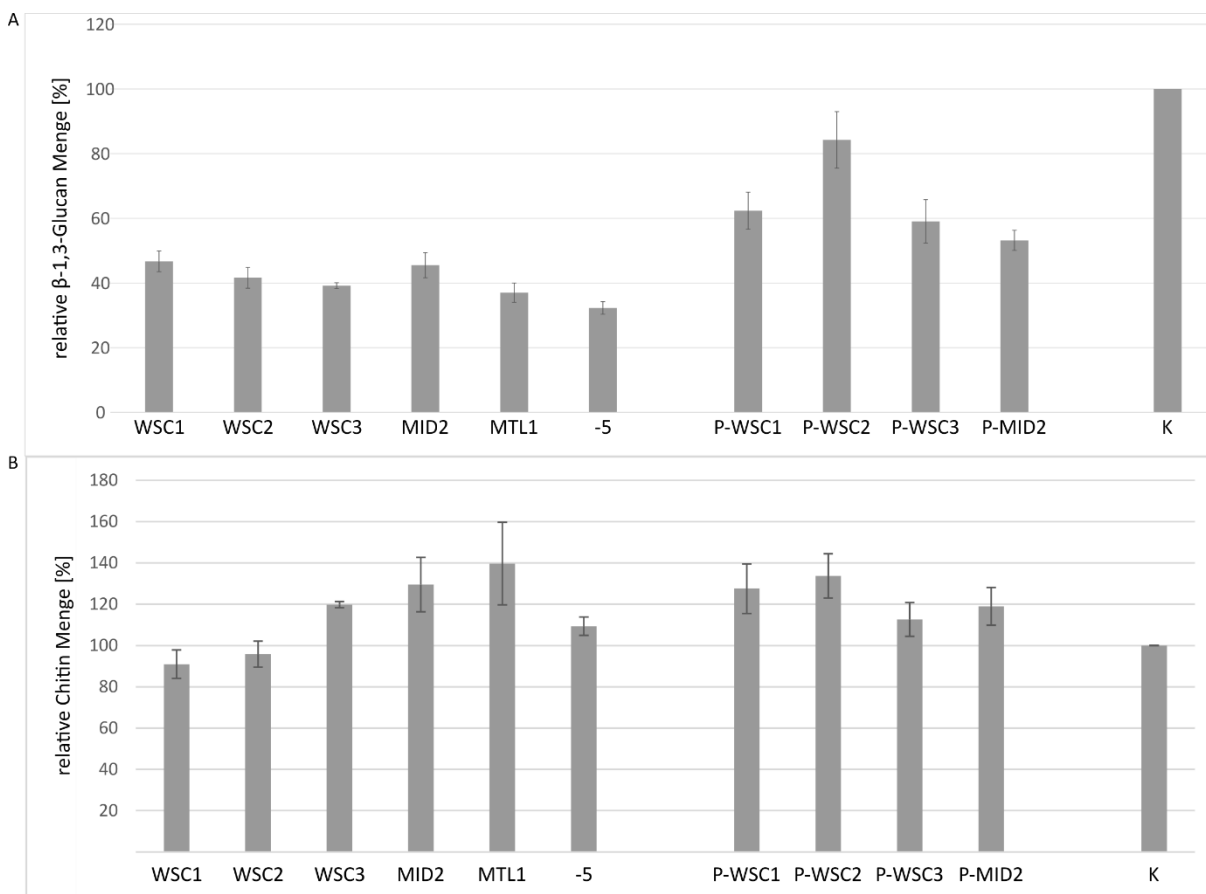


Abbildung 12: Untersuchung der β -1,3-Glucan- und Chitinmenge. Die Fluoreszenz der Proben wurden im Fluorimeter analysiert. Die Stämme (Set1 und Set2; MAT α) wurden mit 0,05 % Anilinblau oder 10 μ g/ml Trypanblau gefärbt. A: Analyse des β -1,3-Glucan Gehalts. Es wurden je Stamm zwei Klone in der logarithmischen Phase angefärbt und zwei Messungen durchgeführt. Die Stämme wurden in SC-Medium mit allen Aminosäuren angezogen. Die Ergebnisse sind relativ zur Kontrolle gezeigt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. K=YHUM0463. B: Chitinmenge der Set1- und Set2-Mutanten in SC-Medium. Das Experiment wurde wie in A durchgeführt, die Färbung erfolgte mit 10 μ g/ml Trypanblau. Die Menge an Chitin, welche in der Kontrolle bestimmt wurde, wurde je Stamm auf 100 % gesetzt, die Mengen in den Mutanten wurden relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardfehler.

Durch die Färbung mit Anilinblau und Trypanblau sollte der Glucan- und Chitingehalt in den Stämmen der Sets 1 und 2 bestimmt werden. Dafür wurden diese Stämme bis zum Erreichen der logarithmischen Phase in SC-Medium angezogen und eine Färbung der Zellen mit dem jeweiligen Farbstoff durchgeführt. Es wurde kein YPD-Medium verwendet, da dieses oft eine starke Autofluoreszenz

aufweist, welche die Messungen stören könnte. Die Messung der Fluoreszenzwerte der einzelnen Proben wurde mit Hilfe eines Fluorimeters durchgeführt.

In einem Stamm, in dem kein Sensor mehr vorhanden war (-5), konnte gezeigt werden, dass die Menge an Glucan stark verringert war, sie sank auf ca. 30 % im Vergleich zum Kontrollstamm. Es zeigte sich zudem, dass in allen weiteren Stämmen die relative Menge an Glucan zum Kontrollstamm niedriger war. So ergaben sich für WSC1-3, MID2 und MTL1 Werte um ca. 40 % oder für P-WSC1-3 und P-MID2 zwischen 55 % (MID2) und 80 % (WSC2) im Vergleich zur Kontrolle, deren Glucanmenge auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 12A). Bei der Analyse der Chitinmenge war zu erkennen, dass diese im -5-Stamm annähernd der rechnerisch auf 100 % gesetzten Kontrolle glich. Dies war auch für die Stämme WSC1 und WSC2 zu beobachten. In den restlichen Mutanten fand sich relativ zum Kontrollstamm etwas mehr Chitin (ca. 110 % - 140 %; Abbildung 12B).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Abwesenheit von vier bzw. allen Sensoren einen großen Einfluss auf die Menge des Glucangehalts hat, während der Chitingehalt weniger betroffen war. Dies könnte darauf hinweisen, dass unter Normalbedingungen die Glucansynthese von den Wsc- und Mid-Sensoren beeinflusst wird und nur ein einzelner Sensor nicht für eine normale Menge Glucan sorgen kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Stämme, in denen nur ein oder kein Sensor vorhanden ist, unter stressfreien Bedingungen keine Wachstumseinschränkungen aufweisen und auch die Lokalisation der jeweiligen Sensoren nicht von der Abwesenheit der anderen Wsc- und Mid-Proteinen beeinflusst wird. Auch die Menge an unmodifiziertem Slt2 und die Chitinmenge wird wenig durch die Ab- und Anwesenheit der einzelnen Sensoren verändert. Dagegen scheint die Proteinmenge der Sensoren in Abwesenheit anderer Sensoren modifiziert zu sein, der Glucangehalt reduziert zu sein und der Anteil an phosphoryliertem Slt2 scheint ebenso von der Anwesenheit mehrerer Sensoren abzuhängen.

2.1.4 Funktion der Sensoren bei der Vermittlung von Stressresistenzen

Zellwachstum

Um weiter zu untersuchen, welche spezifischen Funktionen die einzelnen Wsc-/Mid-Sensoren in *S. cerevisiae* innehaben könnten, sollte mit Hilfe der in 2.1.1 hergestellten Hefestämme (Set1 und Set2) analysiert werden, wie sich die An- und Abwesenheit der Sensoren auf das Wachstum der Hefen unter verschiedenen Stressbedingungen auswirkt. Hierzu wurden die Stämme aus Set1 und Set2 unter dem Einfluss von Zellwandstress (Caspofungin und Kongorot), Membranstress durch Ethanol (EtOH), Koffein (CWI-Aktivierung), reduktivem Stress (Dithiothreitol, DTT), Aminosäuremangelstress (3-Amino-1,2,4-triazol, 3-AT) und DNA-Stress (Methylmethanesulfonat, MMS) untersucht.

Der Farbstoff Kongorot beeinflusst, vergleichbar mit Calcofluorweiß die Zellwand, indem es sich vermutlich an das Chitin und die Glucanfasern anlagert und so die Verknüpfung der verschiedenen Ketten in der Zellwand verhindert (Ram & Klis, 2006; Kopecka & Gabriel, 1992; Roncero & Durán, 1985; Vannini *et al.*, 1983). Im Gegensatz dazu schädigt das Antimykotikum Caspofungin die Zellwand, indem es die β -1,3-Glucansynthase hemmt (Deresinski & Stevens, 2003). Ethanol ist kein Zellwandgift, es wirkt aber auf die Zellmembran, indem es die Permeabilität dieser erhöht (Marza *et al.*, 2002). Koffein gilt als Substanz, die den CWI aktiviert. Dabei ist nicht endgültig geklärt, wie Koffein als direktes Zellwandgift arbeiten könnte, jedoch ist bekannt, dass unter Koffeinstress die Kinase Slt2 phosphoryliert wird und Koffein wahrscheinlich Auswirkungen auf den TORC1 Protein Komplex hat (Kuranda *et al.*, 2006b; Martin *et al.*, 2000). DTT stört die Proteinfaltung, indem es auf Disulfidbrücken wirkt. 3-AT kann den Metabolismus stören, da es ein Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes darstellt und MMS löst DNA-Stress aus, indem es die Bildung von Replikationsgabeln verhindert (Lundin *et al.*, 2005; Hilton, 1960; Konigsberg, 1972).

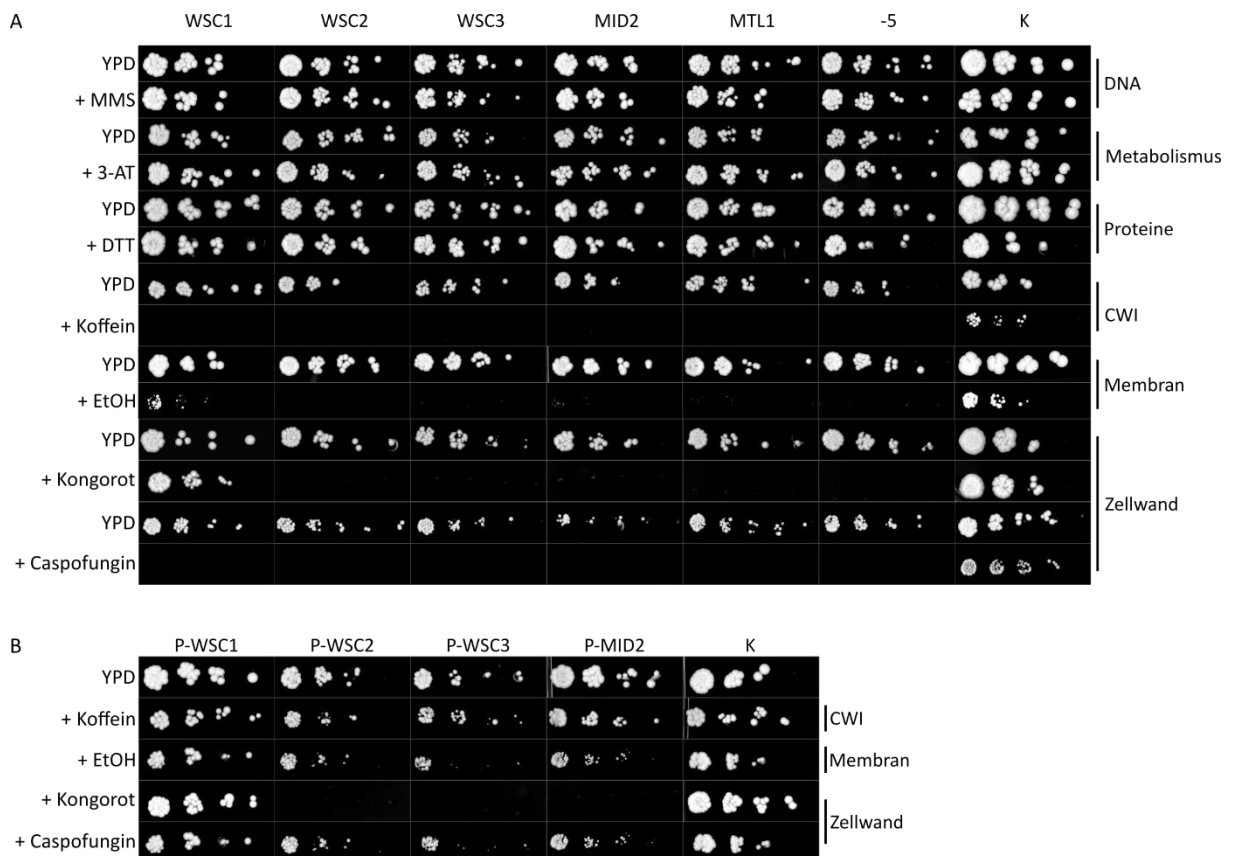


Abbildung 13: Wachstumstest unter verschiedenen Stressbedingungen. A: Die *MATα*-Stämme wurden in Verdünnungsreihe (1/5) auf YPD-Platten oder YPD-Platten + 4 mM DTT, 0,01 % MMS, 10 mM 3-AT, 5 % EtOH, 100 µg/ml Kongorot, 0,5 µg/ml Caspofungin oder 1,5 mg/ml Koffein aufgetropft. Die Platten wurden drei bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend fotografiert. Die hier gezeigten Stämme wuchsen je Bedingung auf einer Platte. Verwendet wurden Stämme aus Set1 und K=YHUM0463. B: Die Stämme wurden wie in A aufgetragen. Es handelt sich um *MATα*-Stämme aus Set2. Alle Tropftests wurden am gleichen Tag durchgeführt, deshalb ist nur eine YPD-Kontrolle gezeigt. Verwendet wurden Stämme aus Set2 und K=YHUM0463

Mit Hilfe der Zellwandstresse, EtOH und Koffein sollten die Auswirkungen der Ab- und Anwesenheit der Sensoren auf Prozesse, in die der CWI verwickelt ist, untersucht werden. Untersuchungen der

Stresse, die auf andere zelluläre Prozesse wirken, wie DNA-, Protein- und Aminosäurestress, sollten dabei als Kontrollversuche dienen, die ausschließen, dass die Zellen der Stämme aus Set1 und Set2 durch die eingefügten Mutationen generelle zellulären Probleme aufweisen.

Der Einfluss der verschiedenen Substanzen wurde zunächst durch Tropftests auf YPD- und YPD + Stress-Agarplatten überprüft. Dafür wurden die verschiedenen Stämme in vergleichbarer Menge und in einer Verdünnungsreihe auf die verschiedenen Platten aufgetropft. Bei diesen Tropftests konnte erneut festgestellt werden, dass alle Stämme aus Set1 und der Kontrollstamm auf YPD-Platten vergleichbar wuchsen. Es war außerdem festzustellen, dass DTT, MMS und 3-AT keinen Einfluss auf das Wachstum der Mutantenstämme hatten, sie wuchsen vergleichbar mit der Kontrolle. Dies bedeutet, dass die untersuchten Stämme keine Defizite in zellulären Prozessen aufwiesen, die nicht mit einer CWI-Funktion verknüpft sind.

Bei Platten, die 5 % EtOH enthielten, war zu erkennen, dass bereits die Kontrolle eingeschränkt wachsen konnte, WSC1 zeigte ein sehr schwaches Wachstum, während WSC2, WSC3, MID2, MTL1 und -5 nicht wuchsen. Daraus lässt sich schließen, dass Zellen mit nur einem oder keinem Sensor nur sehr schlecht oder keine Resistenz gegen Membranstress vermitteln können.

Auf Platten mit dem Zellwandstress Kongorot, konnte gezeigt werden, dass Wsc1 eine Resistenz gegen dieses Gift vermittelte, weil die Mutante, die nur noch dieses Protein enthielt (WSC1), ein sehr gutes und mit der Kontrolle vergleichbares Wachstum zeigte. Alle anderen Mutanten waren nicht in der Lage auf Kongorot-Platten zu wachsen.

Wurden die Mutanten dem Zellwandstress Caspofungin in einer Menge von 0,5 µg/ml ausgesetzt, konnte festgestellt werden, dass keine davon wuchs. Die Kontrolle zeigte auf Platten mit Caspofungin ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zum Wachstum auf YPD.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich auf Platten, auf denen die Stämme Koffein-Stress ausgesetzt wurden. Auch hier konnte keine der Mutanten wachsen und die Kontrolle zeigte leicht verringertes Wachstum (Abbildung 13A). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Wsc1 spezifisch Resistenz gegen Kongorot vermitteln kann, jedoch keiner der Sensoren alleine Resistenz gegen Caspofungin oder Koffein bietet.

Anschließend sollte untersucht werden, ob durch Überexpression der einzelnen Proteine eine Resistenz gegen EtOH, Kongorot, Caspofungin und Koffein erreicht werden konnte. Dafür wurden die Mutanten mit ausgetauschtem Promotor (Set2) ebenfalls durch Tropftests analysiert. Dabei konnte für Kongorot festgestellt werden, dass auch durch eine größere Menge an Wsc2, Wsc3 und Mid2 kein Wachstum der Stämme möglich war. Im Gegensatz dazu konnte eine größere Menge an Wsc1, Wsc2, Wsc3 und Mid2 eine Resistenz der Mutanten gegen Caspofungin, Koffein und EtOH vermitteln. Bei den Stämmen P-WSC1 und P-MID2 konnte ein annähernd vergleichbares Wachstum wie beim

Kontrollstamm festgestellt werden. P-WSC2 und P-WSC3 zeigten auf EtOH und Caspofungin ein verringertes Wachstum im Vergleich zu P-WSC1 und P-MID2 (Abbildung 13B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die An- und Abwesenheit der Sensoren keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme hat, wenn diese Stresssubstanzen ausgesetzt wurden, die nicht auf den CWI oder Zellwand und -membran wirken. Für Wsc1 konnte eine spezifische Funktion für die Kongorotresistenz festgestellt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass keiner der Sensoren in normaler Menge Resistenz gegen Caspofungin oder Koffein vermitteln konnte. Eine Überexpression der einzelnen Sensoren führte jeweils zu einem Wachstum bei EtOH-, Caspofungin- und Koffein-Anwesenheit. Dies weist auf eine nicht spezifische Funktion der Sensoren bei diesen Stressen hin, welche jedoch Proteinmengen-abhängig ist.

Zellviabilität

In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss der Substanzen Kongorot, Caspofungin, Koffein und EtOH auf die Zellviabilität mit einem Resazurin-Assay untersucht werden. Resazurin, auch als Alamarblau bekannt, ist ein ungiftiger, zunächst nur schwach fluoreszierender Farbstoff, der von lebenden Zellen zu der fluoreszierenden Substanz Resorufin reduziert und anschließend bei weiterer Inkubation zu der nicht fluoreszierenden Substanz Hydroresorufin umgewandelt wird. Dadurch kann man durch eine Messung der Fluoreszenz von Zellsuspensionen, die verschiedenen Bedingungen ausgesetzt wurden, analysieren, ob und wie viele lebendige Zellen in diesen vorhanden sind (O'Brien *et al.*, 2000; Fai & Grant, 2009; Nakayama *et al.*, 1997). Für den Resazurin-Assay wurden die MAT α -Stämme aus Set1 und Set2 über Nacht in SC-Medium mit allen Aminosäuren inkubiert, morgens wurde die Menge der Zellen, die einer OD₆₀₀ von 0,2 entsprach, in 1 ml frisches SC-Medium, oder SC-Medium mit Kongorot, Caspofungin, Koffein oder EtOH gegeben. Nach einer Inkubation von 4-5 Stunden, wurden die Zellen geerntet und SC-Medium mit Resazurin wurde zugegeben. Es wurde SC-Medium verwendet, um eine erhöhte Autofluoreszenz des Mediums zu verhindern. Die Messung der Fluoreszenz wurde im Fluorimeter bei 37 °C über 2,5 Stunden durchgeführt, bis bei den verschiedenen Proben die höchste, in diesem Zeitraum zu messende Fluoreszenz erreicht wurde, also bevor die Fluoreszenz durch die Entstehung des Hydroresorufin wieder abnahm. Für die Quantifizierung wurde je Bedingung der Fluoreszenzwert des Kontrollstammes auf 100 % gesetzt und die Werte der Mutanten relativ dazu berechnet.

In SC-Medium ohne Stress ist zu erkennen, dass die gemessene Fluoreszenz aller Mutanten entweder identisch oder nur sehr leicht erhöht ist, selbst wenn alle Sensoren abwesend sind. Gab man 5 % Ethanol zum Medium, war zu erkennen, dass die Überlebensrate der Zellen ohne Sensor auf 80 % im Vergleich zum Kontrollstamm absank. Die alleinige Anwesenheit von Wsc1, Wsc2, Mid2 und Mtl1 zeigte dabei keinen Einfluss. Überexprimierte man Wsc1 und Wsc2, so konnte eine Steigerung der

Viabilität beobachtet werden, die bei WSC1 der Kontrolle entsprach und bei WSC2 diese sogar übertraf. Die Anwesenheit von Wsc3 verringerte im Vergleich zum -5-Stamm die Überlebensrate, was durch eine Überexpression des Sensors etwas ausgeglichen werden konnte.

Bei Koffeinstress war auszumachen, dass die Abwesenheit aller Sensoren die Überlebensrate auf ca. die Hälfte, verglichen mit dem Kontrollstamm, senkte. Die Anwesenheit aller anderen Sensoren konnte dies nicht beeinflussen, nur die Anwesenheit einer erhöhten Menge von Wsc1 und Wsc2 konnte die Zellviabilität auf 80 % steigern.

Fügte man Kongorot hinzu war deutlich auszumachen, dass die Zellviabilität im Stamm ohne Sensoren im Vergleich zum Kontrollstamm auf ca. die Hälfte abnahm. Der Sensor MTL1 schien keinen Einfluss

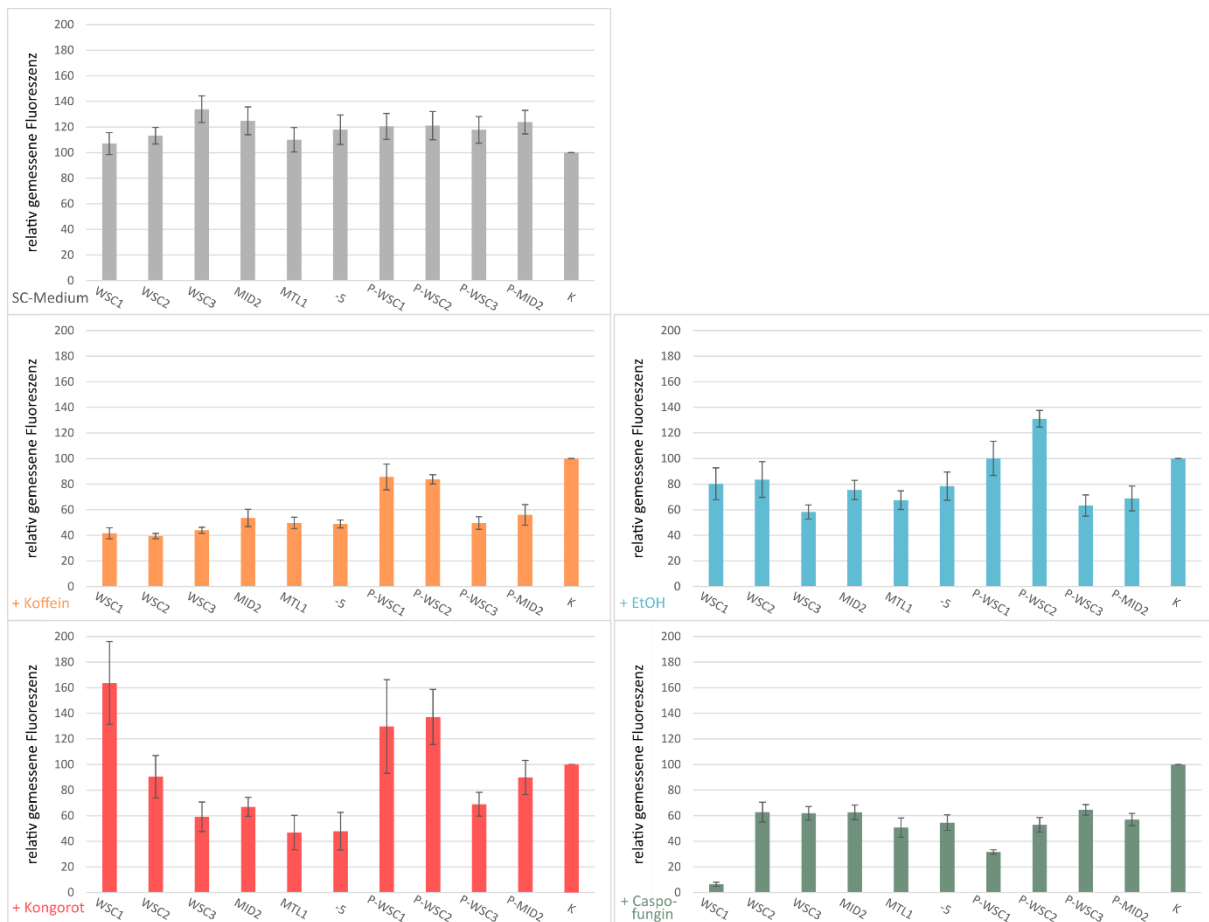


Abbildung 14: Resazurin-Assay unter verschiedenen Stressbedingungen. Die Fluoreszenz des zu Resorufin reduzierten Resazurins wurde mit Hilfe eines Fluorimeters bestimmt. Die Zellen der *MAT α* -Mutanten wurden über Nacht in SC-Medium angezogen und die Menge an Zellen, die 0,2 OD₆₀₀ entspricht, wurde in 1 ml frisches SC-Medium oder SC-Medium + 100 μ g/ml Kongorot, + 0,5 μ g/ml Caspofungin, + 1,5mg/ml Koffein oder + 5 % EtOH gegeben. Die Proben wurden 4-5 h bei 30 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Es wurde zu jeder Probe 115 μ l SC-Medium und 85 μ l 0,02 % Resazurinlösung gegeben. Diese wurden dann bei 37 °C schüttelnd inkubiert und die Fluoreszenz für 2,5 h alle 15 min gemessen. Die Diagramme zeigen den relativen Wert der in dieser Zeit am höchsten gemessenen Fluoreszenz im Vergleich zum Fluoreszenzwert des Kontrollstamms YHUM0463, der je Bedingung auf 100 % gesetzt wurde. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Verwendet wurden Stammsset1 und 2.

auf die Lebensfähigkeit bei Kongorotstress zu haben, da auch hier die nur die Hälfte der Zellen überlebte. Dagegen boten Wsc3 und Mid2 eine leicht erhöhte Viabilität er Zellen, welche durch Überexpression dieser Sensoren zudem leicht gesteigert werden konnte. Betrachtete man den WSC2-

Stamm, so zeigte sich, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen fast der der Kontrolle entsprach, durch Überexpression konnte diese sogar übertroffen werden. Wsc1 schien sowohl mit nativem, als auch mit *ADH*-Promotor alleine eine besser Zellviabilität zu vermitteln, als in Anwesenheit der anderen Sensoren.

Setzte man die Zellen 4-5 Stunden Caspofungin aus, so zeigte der -5-Stamm eine Überlebensrate von ca. 50 %, im Vergleich zum Kontrollstamm. Erneut konnte Mtl1 keine erhöhte Viabilität vermitteln. Allerdings konnte durch Anwesenheit aller Sensoren, bis auf Wsc1, die Überlebensrate auf ca. 60 % gesteigert werden, eine Überexpression der Sensoren zeigte dabei keinen Einfluss. Überraschenderweise reduzierte die alleinige Anwesenheit von Wsc1 die Viabilität auf unter 10 %. Durch eine Überexpression von Wsc1 konnte diese auf 25 % gesteigert werden, was allerdings nur der Hälfte der überlebenden Zellen, die keinen Sensor tragen, entsprach (Abbildung 14).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die alleinige Anwesenheit von Wsc3, Mid2 und Mtl1 bei keinem der untersuchten Stresse einen bemerkenswerten Überlebensvorteil für die Zellen hervorbringt. Wsc2 brachte vor allem in der überexprimierten Form einen Vorteil in der Zellviabilität bei Koffein, EtOH und Kongorot. Wsc1 steigerte bei Kongorotstress die Überlebensrate auf das ca. 1,5fache im Vergleich zum Kontrollstamm, was die Spezifität dieses Sensors für die Erkennung von Kongorot untermauert. Überraschenderweise zeigte allerdings ein WSC1-Stamm bei Caspofungin eine stark verringert Viabilität im Vergleich zu allen anderen Stämmen. Dies bedeutet, dass die alleinige Anwesenheit von Wsc1 einen starken negativen Einfluss auf die Überlebensrate hat.

Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges

Der CWI wird vor allem bei Zellwandstress, aber auch bei Einfluss anderer Substanzen, wie z.B. Koffein aktiviert (Levin, 2011). In dieser Arbeit sollte daher analysiert werden, ob dieser Befund auch für Mutanten, in denen nur ein Wsc- oder Mid-Protein vorhanden ist, bestätigt werden kann. Überprüft werden sollte dies erneut durch die Untersuchung der Phosphorylierung der Proteinkinase Slt2. Dafür wurden quantitative Western-Blot-Analysen unter verschiedenen Stressbedingungen durchgeführt. Die Mutanten wurden zwei Stunden den jeweiligen Stressen ausgesetzt, um anschließend die Proteine der auf diese Weise behandelten Zellen zu isolieren. Die quantifizierten Werte der phosphorylierten Version (Slt2-P) wurden für die Berechnungen durch die Werte der unmodifizierten Proteine dividiert (Slt2).

Setzte man die Stämme aus Set1 einem Einfluss durch 1,5 mg/ml Koffein aus, zeigte sich im Falle von -5 und MID2, dass der Anstieg der phosphorylierten Proteinmenge unter Stress der Erhöhung des phosphorylierten Anteils der Kontrolle gleich. Für die anderen Stämme konnte erkannt werden, dass sich der Anteil an phosphoryliertem Slt2 im Vergleich zur Kontrolle unter Stress bei WSC1 (auf 600 %), WSC2 (auf 550 %), WSC3 (auf 380 %) und MTL1 (auf 350 %) relativ zur Kontrollkultur, welche jeweils

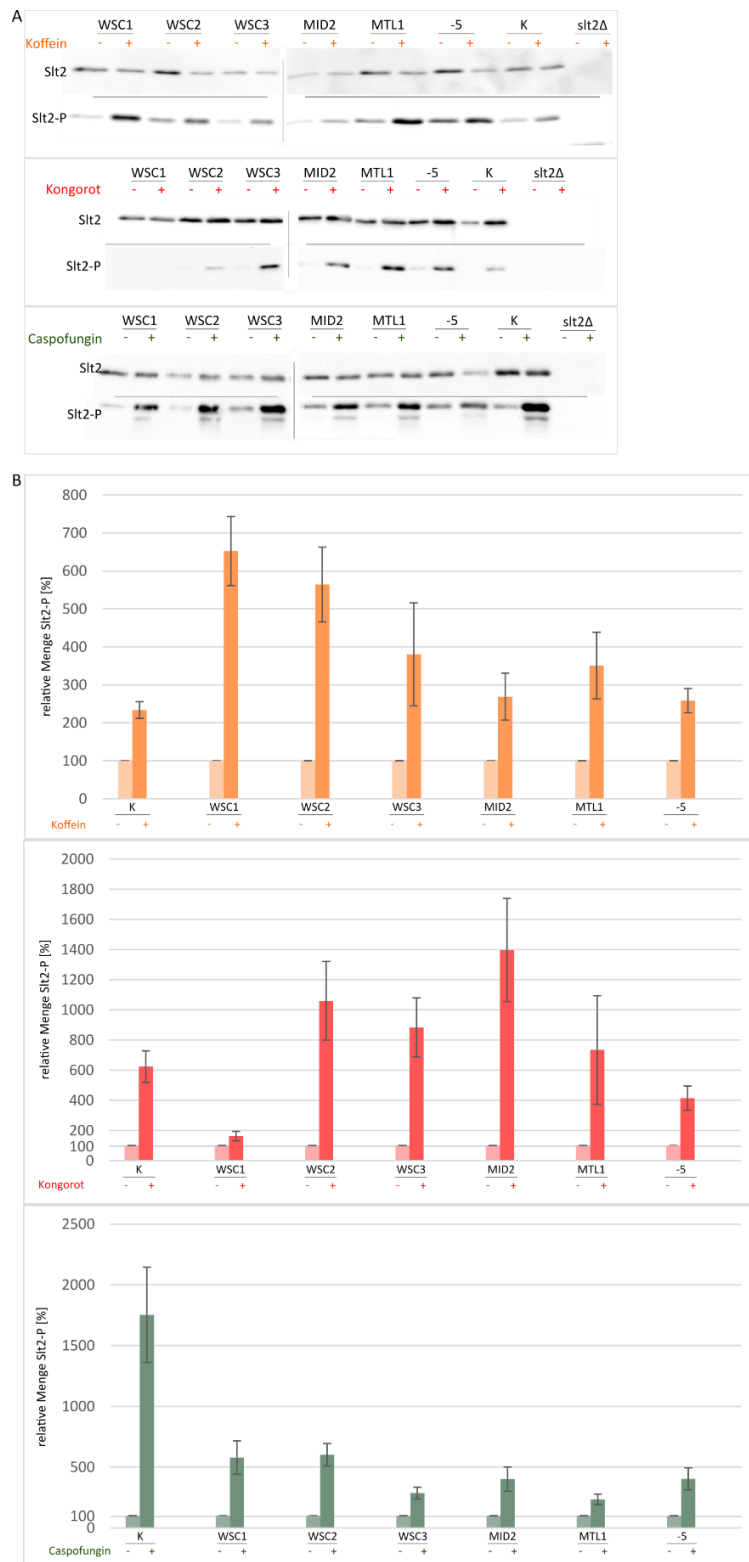


Abbildung 15: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Koffein- Caspofungin- und Kongorotstress. A: Beispielhafte Western Blots. Die Stämme (Set1; MAT α) wurden zunächst in YPD bis zur logarithmischen Phase angezogen. Dabei wurden je Bedingung für jeden Stamm zwei Kulturen angesetzt. Anschließend wurde zu einer der beiden Kulturen 1,5 mg/ml Koffein, 0,5 μ g/ml Caspofungin, oder 100 μ g/ml Kongorot zugegeben und alle Kulturen weitere zwei Stunden inkubiert. Die Proteine wurden extrahiert und ein SDS-PAGE und Western Blot wurde durchgeführt. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)-Antikörper detektiert. K=YHUM0463. B: Quantifizierung der Western Blots. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Es wurde für jede Mutante und die Kontrolle die Menge an Slt2-P ohne Stress auf 100 % gesetzt und die Menge bei Stress ist jeweils relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

auf 100 % gesetzt wurde, erhöhte. Anhand des Western Blots ist zusätzlich zu erkennen, dass die verwendeten Antikörper spezifisch für Slt2 und Slt2-P waren, da in der *slt2Δ*-Kontrolle keine unspezifischen Banden zu sehen waren (Abbildung 15).

Setzte man die gleichen Stämme dem Zellwandstress Kongorot aus, war deutlich zu erkennen, dass bei WSC1 die Phosphorylierung von Slt2 unter Stressbedingung annähernd der ohne Stress entspricht. Bei den anderen Mutanten war zu beobachten, dass der Anteil an phosphoryliertem Slt2 im Vergleich zu der relativen Menge der phosphorylierten Kinase des Kontrollstammes unter Stress erhöht war (600 %-1400 %; WSC2, WSC3, MID2 und MTL1) oder sich nur leicht verringerte (400 %; -5; Abbildung 15B).

Bei Zellwandstress, ausgelöst von 0,5 µg/ml Caspofungin, war eine hohe Menge an Phosphorylierung von Slt2 bei der Kontrolle unter Stress (1750 %) im Vergleich zur Bedingung ohne Stress zu erkennen. Bei allen Mutanten war der Anteil phosphorylierten Slt2s unter Stress deutlich verringert im Vergleich zum Kontrollstamm (200 % bei MTL1 bis 500 % bei WSC1 und WSC2). Interessant ist zudem, dass beim Betrachten des Western Blots bei Stress durch Caspofungin bei allen Stämmen eine Doppelbande bei Slt2-P zu erkennen war. Diese schien spezifisch für Caspofungin-Stress zu sein, da sie weder bei den anderen getesteten Stressen noch bei *slt2Δ* zu sehen war (Abbildung 15A).

Diese Resultate zeigten zum einen, dass bei allen eingesetzten Stressen auch eine Slt2-Phosphorylierung ohne Wsc- oder Mid-Sensoren stattfinden konnte, da diese im Vergleich zu den Kulturen ohne Stresssubstanz im -5-Stamm immer erhöht war. Zudem korrelierte die Anwesenheit von phosphoryliertem Slt2 bei Koffein und Kongorot nicht mit dem Wachstum der Zellen bei denselben Stressen. Eine Erhöhung des Anteils von Slt2-P führte bei den untersuchten Mutantenstämmen nicht unbedingt zu einer Wachstumsfähigkeit. Außerdem wird durch die sehr geringe Menge an phosphoryliertem Slt2 im WSC1-Stamm bei Kongorotstress angedeutet, dass die durch Wsc1 vermittelte Resistenz nicht über eine Aktivierung des CWIs über phosphorylierte Slt2-Proteinkinasen stattfindet.

Um auszuschließen, dass eine eventuelle Phosphorylierung im WSC1-Stamm zu einem früheren Zeitpunkt, als zwei Stunden nach Kongorotzugabe, stattgefunden hat, wurde die Slt2-Phosphorylierung von WSC1, einem Kontrollstamm und als weitere Kontrolle, einer *wsc1Δ*-Mutante, nach 0 min, 15 min, 30 min und 45 min analysiert. Dabei war festzustellen, dass sowohl bei *wsc1Δ*, als auch bei der Kontrolle die Phosphorylierung unter Stress im Vergleich zur Kontrollkultur, bei 15 min am höchsten war und zu 30 min bzw. 45 min leicht abnahm. Außerdem war zu erkennen, dass im WSC1-Stamm auch zu den früheren Zeitpunkten nach Kongorotzugabe keine, oder eine sehr geringe Slt2-Phosphorylierung im Vergleich zur Menge an phosphoryliertem Protein bei der Bedingung ohne Stress vorhanden war (Abbildung 16). Dies weist erneut daraufhin, dass Wsc1 die Resistenz gegen Kongorot nicht über eine Slt2-Phosphorylierung vermittelt.

Da die durchgeführten Wachstumstests unter verschiedenen Stressbedingungen zeigten, dass die Mutanten aus Set2, im Gegensatz zu denen mit natürlichem Promotor aus Set1, auf Caspofungin und Koffein wachsen konnten, sollte mit diesen Mutanten unter diesen beiden Stressbedingungen ebenfalls ein Phosphorylierungs-Assay durchgeführt werden. Es war zu erkennen, dass bei Zugabe von Caspofungin der Anteil an phosphoryliertem Slt2 im Kontrollstamm stark anstieg (auf 3500 % im Vergleich zur Kontrollkultur). Die Mutantenstämme dagegen zeigten einen geringeren Anstieg unter Stress (1000 % bis 1500 %). Dies zeigt erneut, dass der Anteil an phosphoryliertem Slt2 nicht mit der Wachstumsfähigkeit unter Caspofunginstress korreliert, da die Set2-Stämme hier, vergleichbar mit den



Abbildung 16: Slt2-Phosphorylierung unter Kongorotstress zu verschiedenen Zeitpunkten. A: Beispielhafte Western Blots zu B. Die Stämme (*MATα*) wurden zunächst in YPD bis zur logarithmischen Phase angezogen. Dabei wurden für jeden Stamm je Bedingung zwei Kulturen angesetzt. Anschließend wurde zu einer der beiden Kulturen 100 µg/ml Kongorot und alle Kulturen weiter inkubiert. Die Proteine wurden bei 0 min, 15 min, 30 min und 45 min nach Zugabe des Kongorots extrahiert und ein SDS-PAGE und Western Blot wurde durchgeführt. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)-Antikörper detektiert. *wsc1Δ*=YHUM2957/2958; *WSC1*=YHUM2895/2896; *K*=YHUM0463. B: Quantifizierung der Western Blots. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Es wurde für jede Mutante und die Kontrolle die Menge an Slt2-P ohne Stress auf 100 % gesetzt und die Menge bei Stress ist jeweils relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Messungen der Stämme aus Set1, eine eher geringe Menge Slt2-P bei Stress aufwiesen, sie jedoch dazu in der Lage waren, bei diesem Stress zu wachsen.

Unter Koffeineinfluss war auszumachen, dass die Erhöhung des Anteils von phosphoryliertem Slt2 im Vergleich zu Caspofunginstress in der Kontrolle deutlich geringer ausfiel (auf ca. 300 %). Die Mutanten mit *ADH*-Promotor zeigten unter dieser Stressbedingung ein ähnliches Muster, hier stieg der phosphorylierte Anteil von Slt2 unter Stress im Vergleich zur Kontrollkultur ohne Koffein auf ca. 200 % - 600 % an (Abbildung 17).

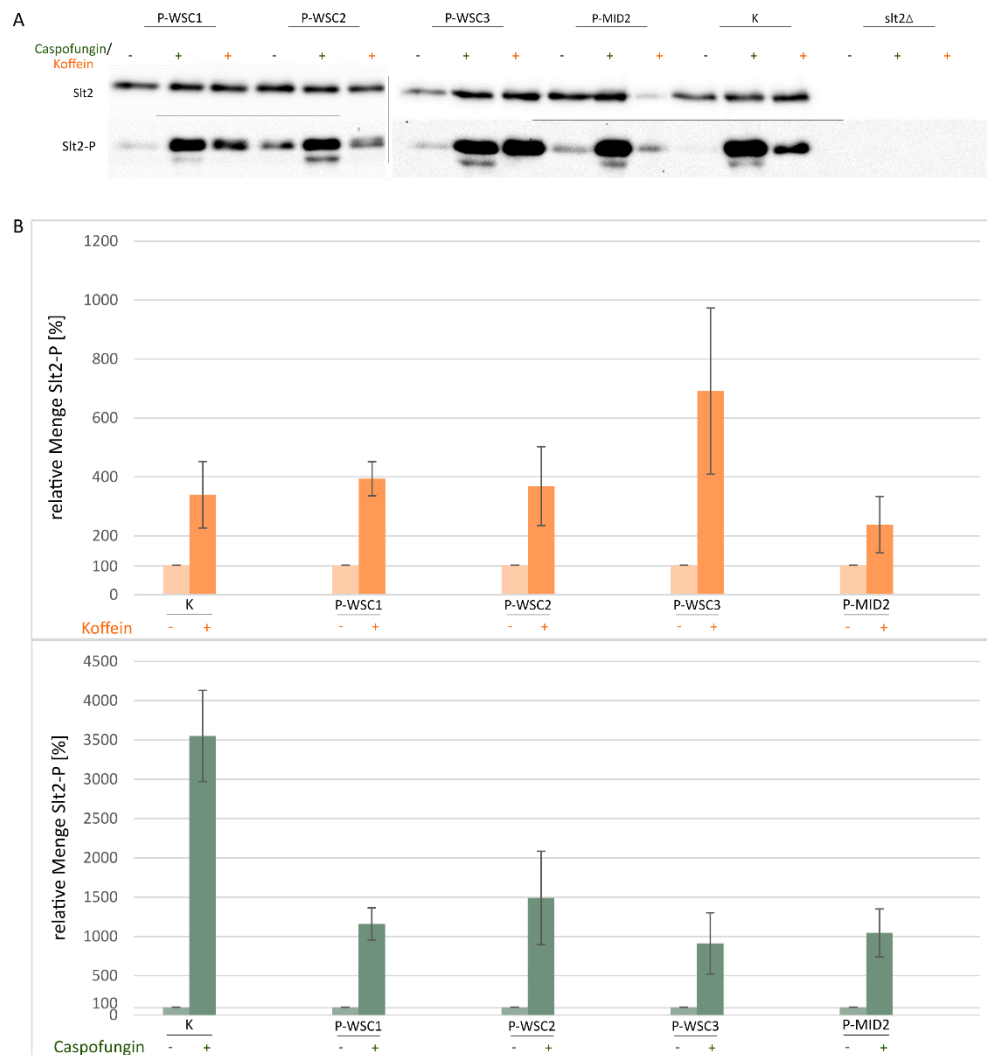


Abbildung 17: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Koffein- und Caspofunginstress. A: Beispielhafte Western Blots. Die Stämme (Set2; *MATα*) wurden zunächst in YPD bis zur logarithmischen Phase angezogen. Dabei wurden für jeden Stamm je Bedingung zwei Kulturen angesetzt. Anschließend wurde zu einer der beiden Kulturen 1,5 mg/ml Koffein oder 0,5 µg/ml Caspofungin zugegeben und alle Kulturen weitere zwei Stunden inkubiert. Die Proteine wurden extrahiert und ein SDS-PAGE und Western Blot wurde durchgeführt. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti Phospho-p44/42 MAP Kinase-Antikörper detektiert. K=YHUM0463. B: Quantifizierung der Western Blots. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Es wurde für jede Mutante und die Kontrolle die Menge an Slt2-P ohne Stress auf 100 % gesetzt und die Menge bei Stress ist jeweils relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Zellwandzusammensetzung

Durch die durchgeführten Tropftests und die Slt2-Phosphorylierungs-Assays zeigte sich, dass die Stämme aus Set1 bei Zellwandstress durch Caspofungin, welcher auf die Glucansynthese wirkt,

eingeschränkt im Wachstum waren und im Vergleich mit der Kontrolle, wie auch die Stämme des Sets2, ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufwiesen.

Daraufhin sollte überprüft werden, ob der Zellwandbestandteil β -1,3-Glucan in den Mutanten in seiner Menge beeinflusst wurde. Die Zellen aller Stämme aus Set1 und Set2 wurden ca. 5-6 Stunden Caspofungin ausgesetzt, anschließend die Menge an Zellen, die $OD_{600}=1$ entsprach mit Anilinblau gefärbt und die Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluorimeters analysiert. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 18A relativ zur Glucanmenge im Kontrollstamm ohne Stresseinwirkung dargestellt.

In Anwesenheit aller Sensoren zeigte sich im Kontrollstamm, dass sich bei Caspofunginstress die Glucanmenge auf 60 % im Vergleich zur Kultur ohne Stress verringerte. Entfernte man alle Sensoren,

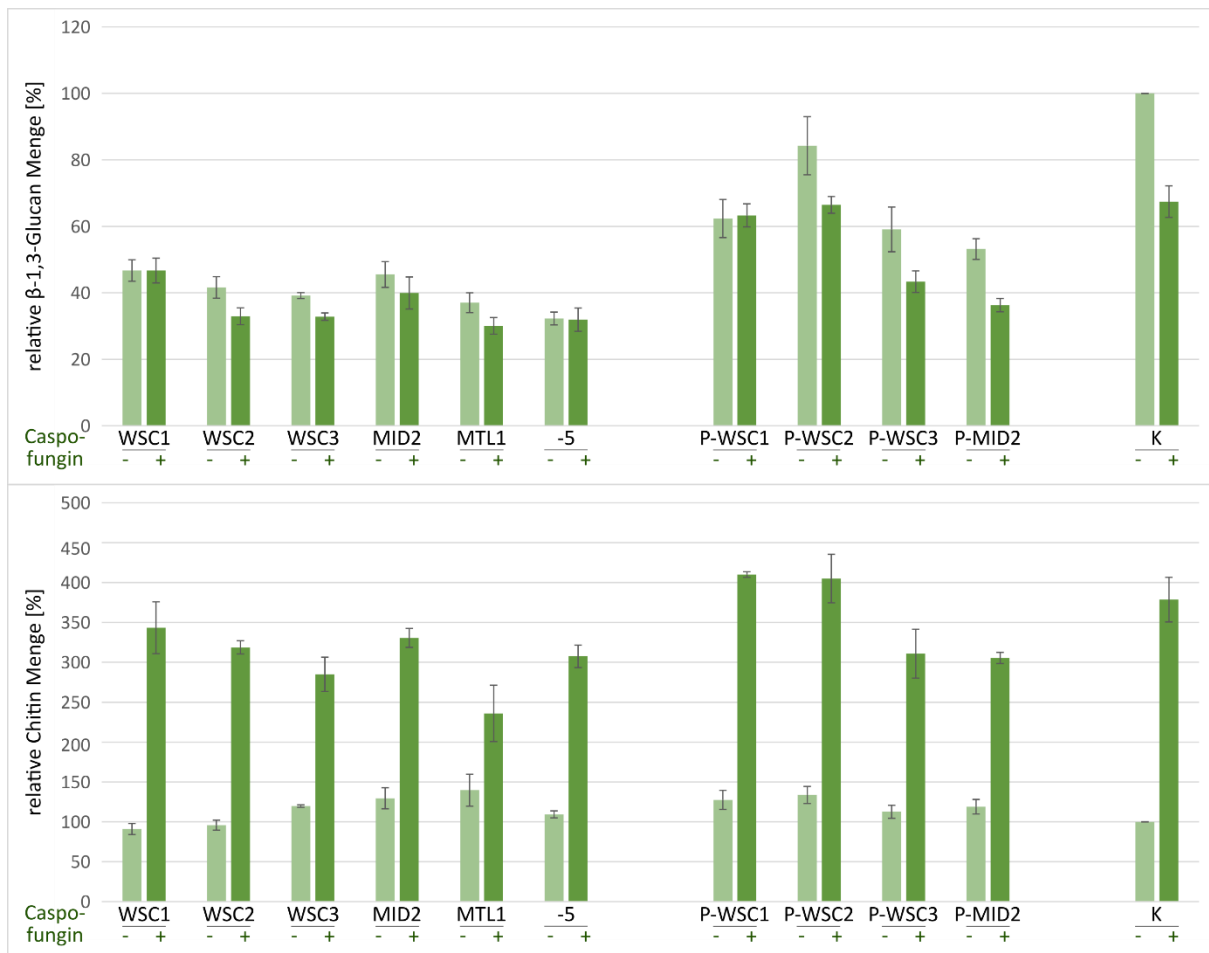


Abbildung 18: Analyse des β -1,3-Glucan- und Chitin-Gehalts unter Caspofungin Stress. A: Analyse der Glucanmenge. Die Zellen aus Set1 und Set2 aus einer Übernachtskultur pro Stamm wurden entweder in SC-Medium oder SC-Medium + 0,5 μ g/ml Caspofungin überführt. Nach 5-6 h wurden die Zellen angefärbt und im Fluorimeter gemessen. Die Ergebnisse sind je Stamm relativ zu dem Wert der Kultur ohne Caspofungin dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. B: Chitingehalt unter Caspofunginstress. Das Experiment wurde wie in A. durchgeführt, die Färbung erfolgte mit 10 μ g/ml Trypanblau. Die gemessenen Werte für Chitin in der Kontrollkultur ohne Caspofungin wurden auf 100 % gesetzt, die Werte der jeweiligen Kultur mit Stress wurden relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardfehler. K=YHUM0463

war zu erkennen, dass die Menge an Glucan sowohl mit, als auch ohne Stress auf ca. 30 % reduziert wurde, die Anwesenheit von Caspofungin brachte dabei keinen Unterschied. Ein ähnliches Bild ist für die Stämme auszumachen, die nur den Sensor Wsc1 enthielten. Auch dort ist der Wert für die Glucanmenge sowohl mit, als auch ohne Stress gleichbleibend, sie liegt bei ca. 50 % bei WSC1 und 60 %

bei P-WSC1. Bei den Stämmen, in denen je nur Wsc2, Wsc3, Mid2 oder Mtl1 vorhanden waren, konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von Caspofungin zu einer Reduktion der Glucanmenge führte. Dies gilt sowohl für die Stämme des Sets1, als auch für Stämme aus Set2, wobei hier die generelle Menge an Glucan höher war, im Vergleich zu den jeweiligen Stämmen mit den Sensoren mit natürlichem Promotor.

Daraus lässt sich schließen, dass Wsc1 wahrscheinlich den Stress Caspofungin nicht wahrnehmen kann, da das Verhalten des WSC1-Stammes dem des Stammes ohne Sensoren gleicht. Alle weiteren Sensoren scheinen zumindest den Stress Caspofungin detektieren zu können, da sie vergleichbar mit dem Kontrollstamm eine Reduktion der Glucanmenge aufweisen.

Im Folgenden sollte anschließend der Einfluss des Zellwandgiftes Caspofungin auf den Zellwandbestandteil Chitin untersucht werden. Dies wurde ebenfalls in den Stämmen aus Set1 und Set2 durchgeführt, welche nach 5-6 h wirkendem Caspofunginstress mit Trypanblau angefärbt wurden. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluorimeter bestimmt, in Abbildung 18B sind die Werte relativ zu der Chitinmenge im Kontrollstamm ohne Stress dargestellt. Setzte man einen Kontrollstamm, der alle Sensoren exprimiert, Caspofunginstress aus, konnte festgestellt werden, dass die Chitinmenge stark auf 350 % anstieg. Ein vergleichbares Ergebnis war für den -5-Stamm zu erkennen. Auch hier wurde der Chitingehalt bei Caspofunginstress auf ca. 300 % gesteigert. War in den Stämmen je einer der Sensoren vorhanden, konnte bei allen Stämmen aus Set1 und Set2 ein ähnliches Muster erkannt werden. Bei allen steigerte sich der Chitingehalt nach Zugabe von Caspofungin auf ca. 250 % - 400 %. Dies weist darauf hin, dass die Sensoren keinen Einfluss auf die Veränderung der Chitinmenge bei Caspofunginstress haben, da auch ohne Sensoren die zu erwartende starke Steigerung der Menge des Chitins zu beobachten war.

2.1.5 Einfluss der Sensoren auf die Oberflächenadhäsion, das Pseudohyphenwachstum und die Biofilmbildung

In der Literatur wird angedeutet, dass die Wsc- und Mid-Proteine Mechanosensoren darstellen könnten (Kock *et al.*, 2015). Für andere pilzliche Mechanosensoren wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Wahrnehmung von Oberflächenänderungen spielen könnten (Kumamoto, 2008). In dieser Arbeit sollte nun unter anderem untersucht werden, ob die CWI-Sensoren eine solche Aufgabe in der Zelle innehaben könnten. Dafür wurde untersucht, wie die Wsc- und Mid-Mutanten auf verschiedene Nährmedien und deren Oberfläche reagieren. Dies wurde anhand der Flo11-abhängigen Phänotypen Adhäsion, Pseudohyphenwachstum und Biofilmbildung durchgeführt (Lo & Dranginis, 1998; Reynolds & Fink).

Flo11-Expression und Agaradhäsion

Da alle Phänotypen, welche hier untersucht werden sollten, von der Anwesenheit des Proteins Flo11 abhingen, sollte zunächst die Expression von Flo11 in den Wsc- bzw. -Mid-Mutanten (Set1) untersucht werden. Bei dieser Immunfluoreszenzanalyse von Flo11 an der Oberfläche der Stämme aus Set1 und einem Kontrollstamm, konnte festgestellt werden, dass Flo11 in allen Stämmen im Vergleich zu einer *flo11Δ*-Kontrolle an der Oberfläche der Zellen vorhanden war. Die Proteinmenge auf der Zelloberfläche war bei allen untersuchten Stämmen (außer *flo11Δ*) vergleichbar (Abbildung 19A).

Anschließend sollte analysiert werden, ob die in dieser Arbeit untersuchten Proteine einen Einfluss auf die Adhäsion zu YPD-Agarplatten hatten. Um die Adhäsion zu testen, wurde ein Agar-Waschtest durchgeführt. Die Set1-Stämme wurden in vergleichbarer Menge auf eine YPD-Agarplatte aufgetropft, fünf Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend unter fließendem Wasser abgewaschen. Hierbei war festzustellen, dass die untersuchten Mutanten im Vergleich zu einer *flo11Δ*-Kontrolle sehr gut an den Agar klebten. Lediglich bei WSC1 schien eine leichte Verringerung der Adhäsion an Agar im Vergleich zur Kontrolle erkennbar (Abbildung 19B).

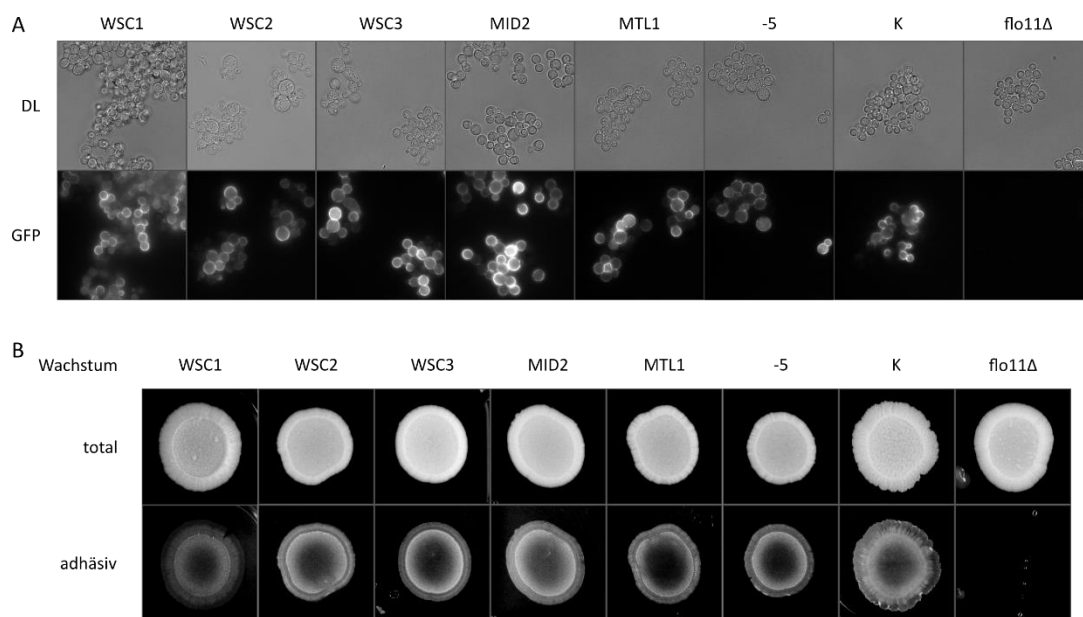


Abbildung 19: Untersuchung der Flo11 Expression und Agaradhäsion. A: Expression von Flo11 in den Wsc- und Mid-Mutanten (Set1). Die Flo11-Expression wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dafür wurden die Stämme in LFM angezogen und in der logarithmischen Phase geerntet und mit einem anti-Flo11-Antikörper markiert. Nach der Behandlung mit dem zweiten Antikörper (Dylight™ 488 gekoppelt) wurden die Proben im Fluoreszenzmikroskop im Durchlicht- und GFP-Kanal untersucht und fotografiert. Der Größenmarker entspricht 5 µm. Set1, K=YHUM0463. B: Analyse der Adhäsion zu Agar. Es wurde ein Agar-Waschtest auf YPD-Medium durchgeführt. Die Stämme wurden in vergleichbarer Menge aufgetropft und die Platte anschließend bei 30 °C fünf Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig unter fließendem Wasser abgewaschen, bis bei der *flo11Δ*-Kontrolle keine Zellen mehr vorhanden waren. Es handelt sich um Set1; K=YHUM0463.

Dies lässt darauf schließen, dass die Wsc- und Mid-Sensoren nicht an der Adhäsion zu Agarmedium beteiligt sind.

Pseudohyphenwachstum

In einem weiteren Schritt wurde das Wachstum auf stickstoffarmen, aber kohlenstoffreichen Medium untersucht. Dafür wurden diploide Hefestämme hergestellt. Hierfür wurden die Stämme des Sets1 und ein Kontrollstamm (YHUM0463, alle *MATα*) mit einer Mutante des anderen Geschlechtstyps ohne aktives Protein (-5, *MATa*; YHUM2893) gekreuzt, um so heterozygote, diploide Mutanten zu erhalten. Diese enthielten dann je nach Stamm entweder keine Kopie der Sensorgene (-5^d), je eine Kopie eines Sensorgenes (WSC1-3^d, MID2^d und MTL1^d), oder je eine Kopie aller Sensorgene (K^d). Es sollte analysiert werden, ob diese Mutanten in der Lage sind, auf dem stickstoffarmen Medium Pseudohyphen auszubilden und invasiv in das feste Medium einzuwachsen. Dabei zeigte sich, dass die Ausbildung von Pseudohyphen auch in den Mutanten möglich war. Im Vergleich zur Kontrolle war jedoch eine leichte Verringerung der Pseudohyphenbildung, vor allem bei WSC3^d und MTL1^d, festzustellen. Dies könnte auf eine leicht verringerte Wachstumsgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen der untersuchten Mutantenstämme hinweisen. Das invasive Wachstum, welches nach Abwaschen der gewachsenen Kolonien sichtbar wurde, ist bei allen Mutanten und der Kontrolle vergleichbar. Sowohl die

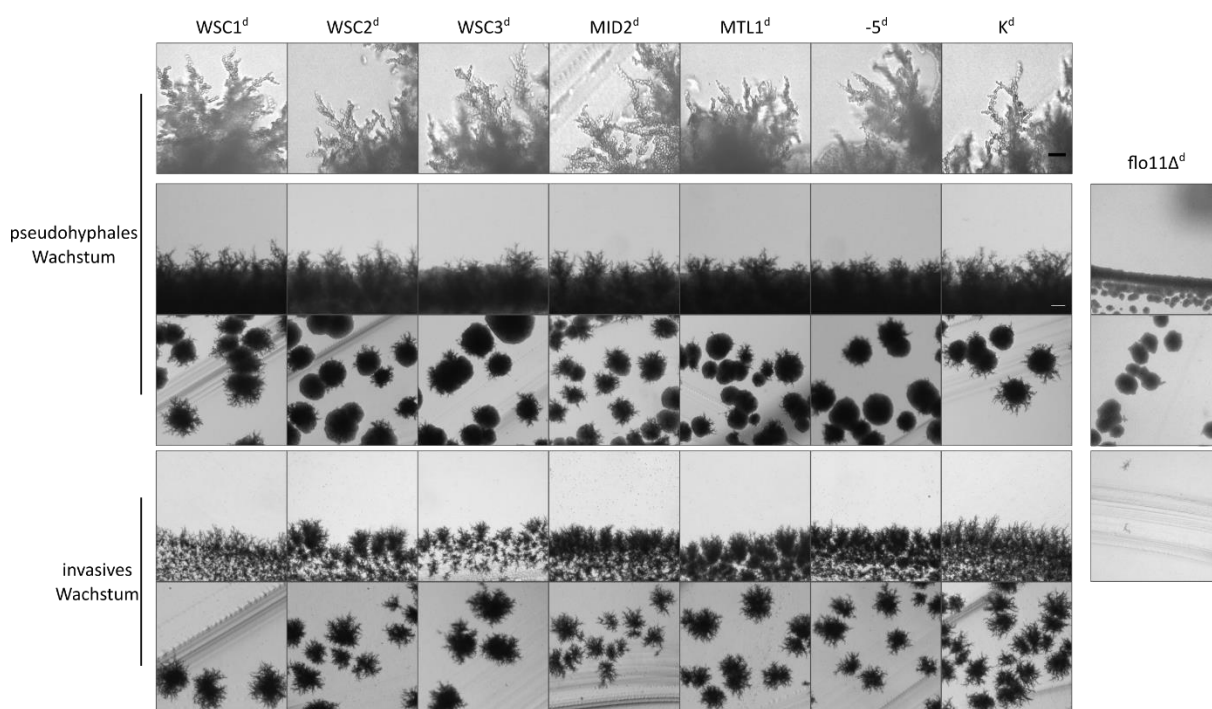


Abbildung 20: Test auf Pseudohyphenbildung. Für das Pseudohyphenwachstum mussten diploide Stämme hergestellt werden. Dafür wurden die *MATα*-Stämme WSC1, WSC2, WSC3, MID2, MTL1, -5 (Set1) und K mit einem -5 *MATa* Stamm (YHUM2893) gekreuzt. Die diploiden Mutanten wurden dann auf SLAD+Trp-Medium vereinzelt und nach fünf Tagen fotografiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig unter fließendem Wasser abgewaschen, um das invasive Wachstum zu untersuchen. Der weiße Größenmarker entspricht 100 μm, der schwarze 20 μm. K=YHUM0463, flo11Δ=YHUM2829 X YHUM2831. Das Experiment mit der flo11Δ-Kontrolle wurde an einem anderen Tag, als bei den restlichen Mutanten und der Kontrolle durchgeführt und dokumentiert.

Pseudohyphenbildung, als auch das invasive Wachstum war in allen Fällen stärker ausgeprägt, als bei einer diploiden *flo11Δ*-Kontrolle (YHUM2829 X YHUM2831; Abbildung 20).

Aus diesem Ergebnis kann geschlussfolgert werden, dass die Wsc- und Mid-Sensoren nicht an der Pseudohyphenbildung und dem dabei vorkommenden invasiven Wachstum beteiligt sind.

Biofilmbildung

Anschließend sollte die Biofilm-Bildung auf halbfesten YPD-Agarplatten getestet werden. Es wurde bereits publiziert, dass Wsc1 einen Flo11-unabhängigen Einfluss auf die Bildung der Biofilme auf halbfestem Medium hat (Reynolds & Fink, 2001; Sarode *et al.*, 2014). Wurden die Wsc- oder Mid-Proteine einzeln, oder auch doppelt deletiert, zeigte sich auch bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung, dass nur die *wsc1Δ*-Mutante eine verringerte Biofilmbildung aufwies.

Die Biofilme der anderen Einzel- und Doppel-Deletionsmutanten waren vergleichbar mit dem Kontroll-Biofilm. Sie zeigten eine große runde Kolonie, welche sich über die Agarplatte ausbreitete. Diese Kolonie oder dieser Biofilm wies starke Strukturen auf (Abbildung 21A).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun aber überraschend, dass Wsc1 alleine keine Biofilmbildung vermitteln konnte. Dies war am reduzierten Biofilm der WSC1 und P-WSC1 Mutante zu erkennen (Abbildung 21B und C). Im Vergleich zu den anderen Stämmen aus Set1 und Set2 war zwar eine geringfügig größere Grundfläche der Filme zu erkennen, aber der Kontrollstamm wies eine deutlich stärkere Biofilmbildung auf. Generell ließ sich feststellen, dass keine der untersuchten Stämme aus Set1 und Set2 in der Lage war, nach vier Tagen strukturierte Biofilme zu bilden.

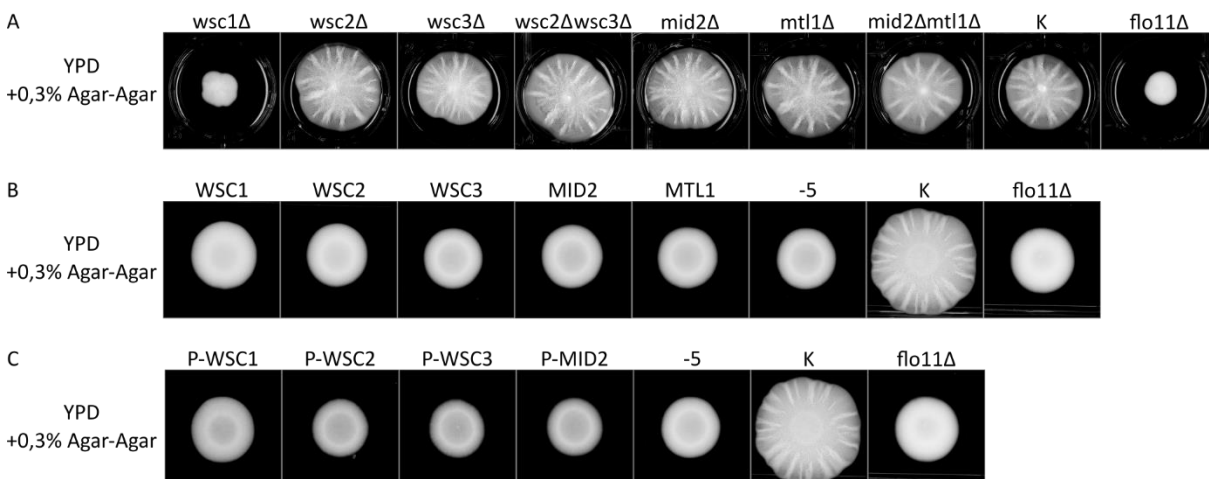


Abbildung 21: Biofilmbildung auf halbfestem Agar. Die Stämme wurden in vergleichbaren Mengen auf die Platten aufgetragen. Die Biofilme wurden vier Tage bei 30 °C inkubiert. A: Es handelt sich um prototrophe Einzel- oder Doppelknock-outs (YHUM2530; YHUM2532; YHUM2534; YHUM2536; YHUM2537; YHUM2541; YHUM 543; K=YHUM0454, *flo11Δ*=YHUM2829). Die Zellen wurden mit einem Zahnstocher angeimpft. Die Biofilme wuchsen in einer Kulturplatte mit 6 Vertiefungen. B: Die hier verwendeten Set1-Stämme wurden auf die Platten aufgetropft. Alle Biofilme wuchsen zusammen auf einer Agarplatte. K=YHUM0463; *flo11Δ*=YHUM2831. C: K, -5 und *flo11Δ* wurden von B übernommen. Es handelt sich um Stämme aus Set2 und diese wurden ebenfalls auf eine Agarplatte aufgetropft.

Um die langfristige Wirkung der Sensoren auf die Biofilmbildung zu überprüfen, wurden Biofilme der Set1-Stämme über sieben, bzw. 14 Tage beobachtet. In Anwesenheit aller Sensoren konnte beim

Kontrollstamm nach sieben Tagen ein stark strukturierter Biofilm beobachtet werden, welcher sich nach 14 Tage weiter ausgebreitet hatte. Ohne Sensoren zeigte sich sowohl bei sieben, als auch bei 14 Tagen ein im Vergleich zum Kontrollstamm sehr reduzierter Biofilm, der keine Strukturierungen aufwies. Nach 14 Tagen war lediglich eine leicht größere Ausbreitung des Biofilms festzustellen. Dieses Resultat ist auch für die anderen Set1-Stämme mit je einem vorhandenen Sensor festzustellen. Die Biofilme glichen dabei zudem dem *flo11Δ*-Kontrollstamm (Abbildung 22A). Dies zeigt, dass auch über einen längeren Zeitraum die Sensoren alleine jeweils nicht dazu in der Lage sind, eine Biofilmbildung zu vermitteln.

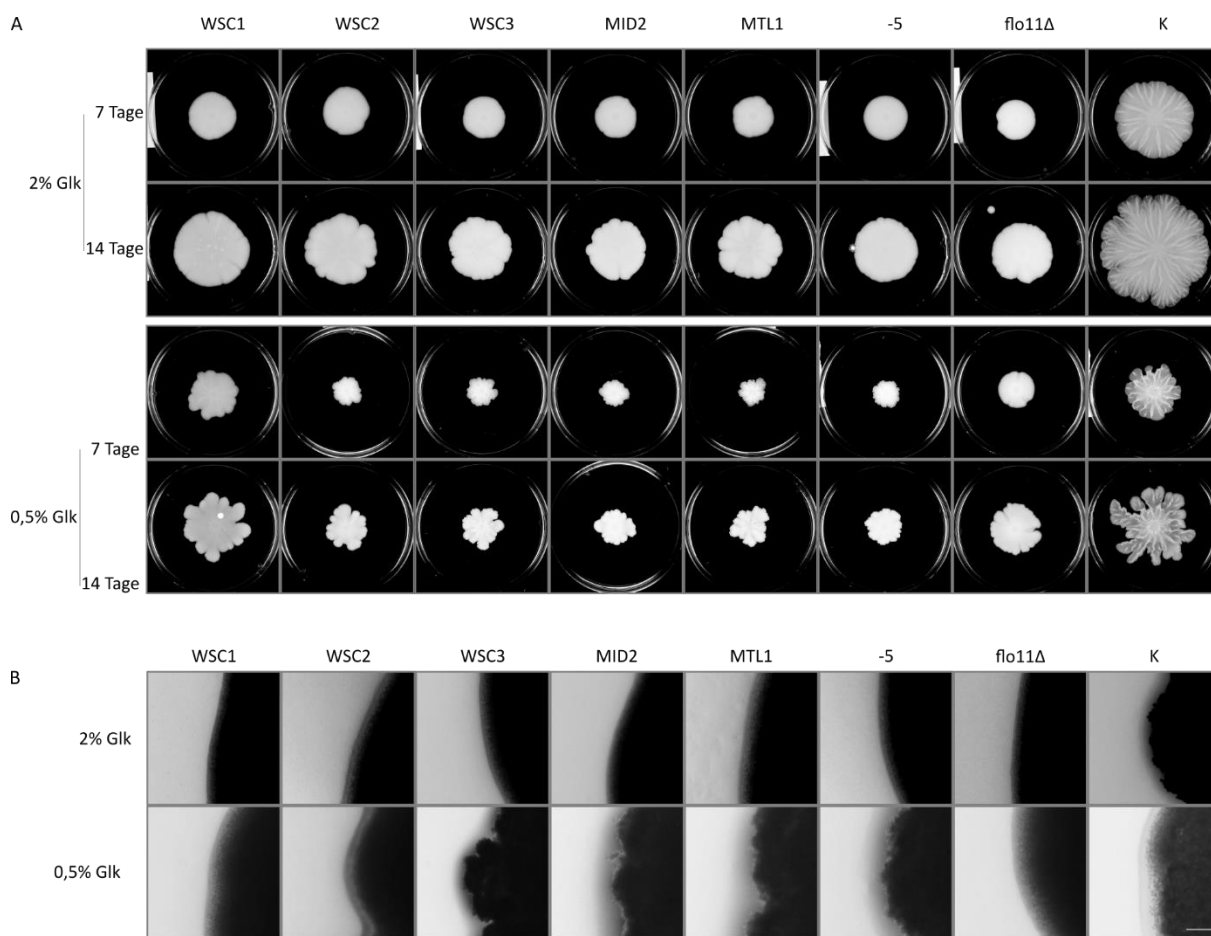


Abbildung 22: Biofilmbildung über 14 Tage auf halbfestem Medium. Die Stämme aus Set1 wurden in vergleichbarer Menge auf halbfestes YP-Medium mit entweder 0,5 % oder 2 % Glukose aufgetropft. A: Nach sieben und 14 Tagen wurden die gewachsenen Biofilme fotografiert. B: Detailaufnahmen der Biofilmränder der Biofilme aus A. Gezeigt sind die Ränder der Biofilme, welche je Stamm auf YP+ 2 % oder 0,5 % Glukose gewachsen waren. Der Größenmarker entspricht 200 μ m. *flo11Δ*=YHUM2831; K=YHUM0463

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Reduktion des Glukosegehaltes zu einer ausgeprägteren Biofilmbildung führt. Dies kann an einer stärkeren Expression von Flo11 unter diesen Bedingungen liegen (Reynolds & Fink, 2001). Deshalb sollte in einem nächsten Schritt die Biofilmbildung der Set1-Stämme über sieben, bzw. 14 Tage auf halbfestem Medium, welches nur 0,5 % Glukose enthielt, beobachtet werden. Dabei war beim Biofilm des Kontrollstammes festzustellen, dass dieser einen unregelmäßigeren Rand als bei 2 % Glukose, aufwies. Das ist sowohl nach sieben, als auch nach 14

Tagen zu beobachten. Außerdem zeigte der Biofilm eine stark ausgeprägte innere Struktur, welche nach 14 Tagen stärker wurde. Ohne Wsc- oder Mid-Sensoren konnte festgestellt werden, dass erneut ein sehr reduzierter Biofilm gebildet wurde, welcher auch nach 14 Tagen keine starke Struktur oder Ausbreitung aufwies, allerdings ebenfalls einen unregelmäßigen Rand. In alleiniger Anwesenheit von Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 konnte ein ähnliches Biofilmmuster wie beim Stamm ohne Sensoren beobachtet werden. Die Ausbreitung dabei war geringer, als beim *flo11Δ*-Stamm. Bei Anwesenheit von Wsc1 konnte gezeigt werden, dass der Biofilm eine stärkere Ausbreitung nach sieben und 14 Tagen, als die anderen Stämme des Sets1 aufwies und nach sieben Tagen eine leichte innere Strukturierung festzustellen war (Abbildung 22A).

Beobachtete man eine *wsc1Δ*-Mutante auf Medium mit 0,5 % Glukose, war zu erkennen, dass diese Mutante bei verringertem Glukosegehalt einen eindeutig strukturierten Biofilm bildete, der sogar deutlicher als der des WSC1- und -5-Stammes aus Set1 war. Die generelle Form des Biofilmes war dabei aber unregelmäßiger als bei der Kontrolle. Außerdem war der Biofilm von -5 auf 0,5 % Glukose kleiner, als der von *wsc1Δ*. Bei 2 % Glukose war eine geringere innere Struktur bei *wsc1Δ* und Kontrolle

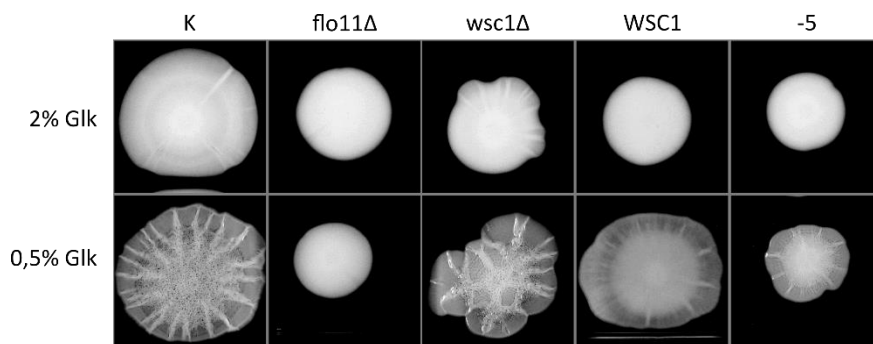


Abbildung 23: Biofilmbildung auf YP-Medium mit 2 % und 0,5 % Glukose. Untersucht wurden die Stämme *wsc1Δ* (YHUM2957), WSC1, -5 (Set1), K (YHUM0463) und *flo11Δ* (YHUM2831). Die Stämme wurden in vergleichbarer Menge aufgetropft und die Biofilme nach vier Tagen fotografiert. Die Stämme wuchsen pro Glukosemenge auf einer Platte.

auszumachen (Abbildung 23).

Dies bedeutet, dass die Abhängigkeit der Biofilmbildung von Wsc1 zum einen vom Nährstoffangebot abhängig ist, oder zum anderen von der Expressionsstärke von Flo11 abhängt. Zudem zeigte sich, dass bei geringerem Glukosegehalt die Abwesenheit von Wsc1 durch die anderen Sensoren kompensiert werden kann. Dies könnte auf eine Zusammenarbeit der einzelnen Sensorproteine hinweisen.

Es ist bereits bekannt, dass um Biofilme, welche auf halbfestem Medium gewachsen sind, eine Art extrazelluläre Matrix vorhanden ist. Diese besteht unter anderem aus Proteinen, welche von der Zellwand abgelöst wurden, wobei Flo11 dabei eine große Menge darstellen und eine wichtige Rolle für die Ausbreitung der Biofilme haben soll (Beauvais *et al.*, 2009). Es sollte nun überprüft werden, ob der Biofilm-Defekt der untersuchten Stämme auf Probleme bei der Bildung extrazellulären Matrix zurückführbar ist. Betrachtete man die Ränder der Biofilme aus Abbildung 22A nach 14 Tagen mit einer

Vergrößerung unter einem Binokular, war vor allen bei den Stämmen, welche auf Medium mit 0,5 % Glukose gewachsen waren, eine Schicht um den Biofilm zu sehen. Diese war beim Kontrollstamm sehr ausgeprägt, ebenso bei WSC2, WSC3, MID2, MTL1 und -5. Bei WSC1 und *flo11Δ* war diese deutlich dünner und schwerer zu erkennen. Ebenso war die Dicke dieser äußeren Schicht bei allen Stämmen auf 2 % Glukose deutlich weniger ausgeprägt und schwer zu erkennen. Hier war sie jedoch auch bei der Kontrolle am klarsten zu beobachten. Es war auch zu sehen, dass bei 0,5 % Glukose die Ränder von WSC3, MID2, MTL1, -5 und der Kontrolle unregelmäßiger waren, als die von WSC1 und *flo11Δ*. Dies war auch bei 2 % Glukose zu erkennen, allerdings waren die Ränder aller Kolonien deutlich glatter (Abbildung 22B).

Es sollte zusätzlich überprüft werden, ob es sich bei der um die Biofilme zu erkennenden Schicht möglicherweise um abgelöste Proteine handelte. Dafür wurden auf eine halbfeste YPD-Agarplatte eine sterile Nitrocellulose-Membran aufgelegt und die verschiedenen Stämme aus Set1 in vergleichbarer Menge auf diese aufgetropft. Somit konnten die Biofilme vier Tage auf dieser Membran wachsen. Die Biofilme auf der Membran waren weniger ausgeprägt, als auf Medium ohne Membran, aber auch hier waren die Biofilmstrukturen der Kontrolle auf 0,5 % Glukose stärker, als auf 2 % Glukose. Die gewachsenen Biofilme wurden abgewaschen und die Membranen mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S färbt alle kovalent an die Membran haftenden Proteine an.

Es war zu erkennen, dass bei allen Biofilmen Proteine abgegeben und anschließend an die Membran

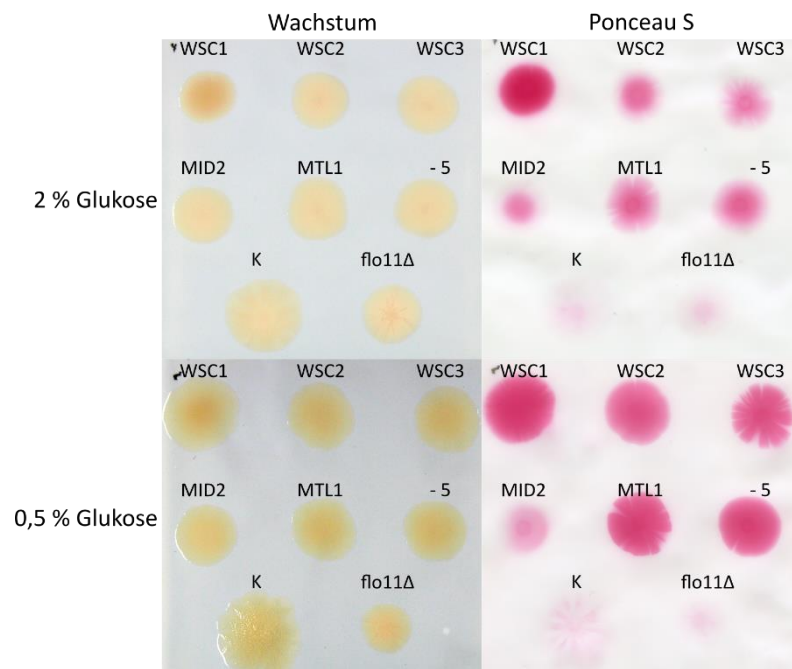


Abbildung 24: Untersuchung auf abgelöste Proteine bei der Biofilmbildung. Die Stämme (Set1) wurden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft und diese dann auf eine halbfeste YP-Platte mit entweder 2 % oder 0,5 % Glukose gelegt. Die Biofilme wuchsen 4 Tage, wurden dann von der Membran abgewaschen und die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt. *flo11Δ*=YHUM2831; K=YHUM0463

gebunden wurden. Allgemein konnte man feststellen, dass bei 0,5 % Glukose mehr Protein, als bei 2 %

Glukose abgegeben wurde. Besonders viel angefärbtes Protein ist bei WSC1 zu erkennen, bei der Kontrolle und *flo11Δ* sehr wenig. Bei WSC2, WSC3, MTL1 und -5 war eine ebenfalls deutlichere Färbung, als bei der Kontrolle zu erkennen. Der MID2-Biofilm zeigte weniger Proteinabgabe, als die anderen Mutanten. Bei WSC1, WSC2 und -5 war die rote Färbung sehr dicht, es war keine Struktur zu erkennen, bei WSC3 und MTL1 schien sie etwas weniger dicht zu sein, da man hier ein strukturelles Muster erkennen konnte (Abbildung 24).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass bei den Stämmen aus Set1 bei der Biofilmbildung Proteine an die Umgebung abgegeben wurden. Dabei korrelierte jedoch die Menge der Matrixproteine nicht mit der Ausbreitung der Biofilme, da z.B. der Kontrollstamm einen sehr ausgeprägten Biofilm und eine deutlich sichtbare Matrix um diesen zeigte, diese jedoch nur wenige Proteine beinhaltete. Dagegen gaben die Set1-Mutanten deutlich mehr Proteine an die Umgebung ab, zeigten allerdings nur eine geringe Ausbreitung der Biofilme. Nur bei WSC1 konnte sowohl eine leicht weitere Ausbreitung und gleichzeitig eine größere Menge abgegebener Proteine festgestellt werden. Deshalb bleibt die Frage nach der Beziehung der extrazellulären Matrix zum eigentlichen Biofilm offen.

2.2 Phänotypische Untersuchung von Wsc1 und Slr2 im Σ 1278b- und S288C-Stammhintergrund von *S. cerevisiae*

Die meisten dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen der Wsc- und Mid-Proteine wurden in Stämmen des S288C-Stammhintergrundes durchgeführt. In dieser Arbeit sollte nun systematisch hinterfragt werden, ob es Unterschiede zwischen den Stammhintergründen S288C und Σ 1278b gibt. Dafür sollten folgende Phänotypen untersucht werden: Zellwachstum, Aktivierung des CWI, Lokalisation der Transkriptionsfaktoren Rlm1 und SBF-Komplex und die Zellwandzusammensetzung. Die Untersuchungen sollten in *wsc1Δ*- und *slr2Δ*-Stämmen beider Stammhintergründe durchgeführt werden, da für den S288C keine Stämme vorhanden sind, die mit dem Σ 1278b Stammset1 und Set2 aus 2.1. vergleichbar wären.

Zellwachstum

Um eventuelle Unterschiede aufzeigen zu können, wurden zunächst Wachstumstests auf Platten mit den Substanzen Kongorot, Caspofungin und Koffein durchgeführt.

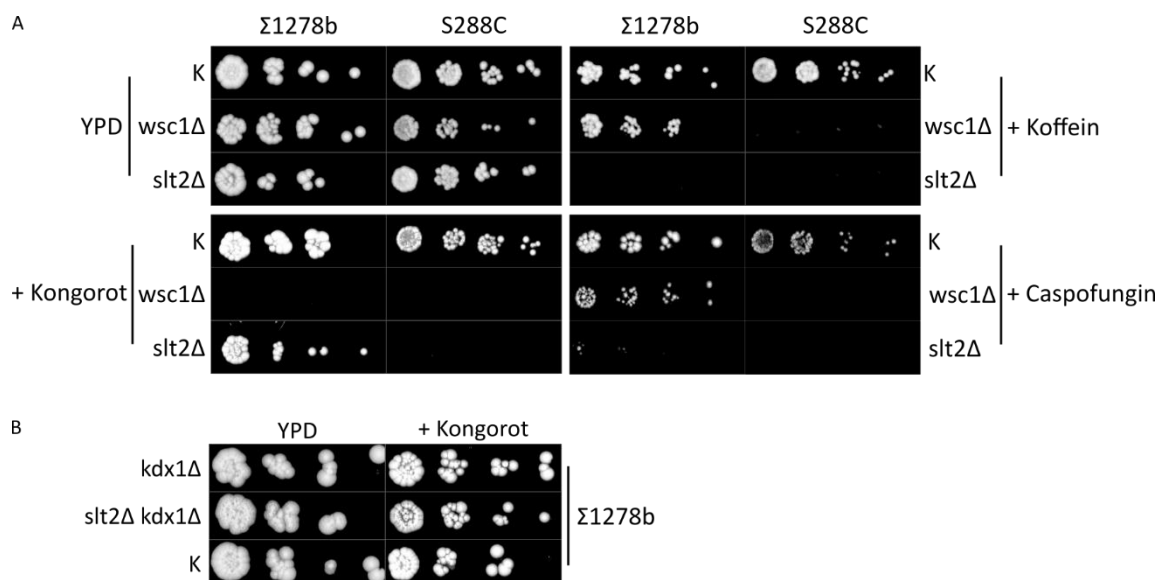


Abbildung 25: Wachstumstest von S288C- und Σ 1278b-Stämmen und -Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen. A: Die verschiedenen Mutanten wurden in Verdünnungsreihe (1/5) auf eine YPD- oder eine YPD-Platte + 100 μ g/ml Kongorot, 0,3 μ g/ml Caspofungin oder 1,5 mg/ml Koffein getropft. Die Stämme befanden sich je Medium auf einer Platte. S288C: *wsc1Δ*=YHUM2959, *slr2Δ*=YHUM2961, K=ESM356; Σ 1278b: *wsc1Δ*=YHUM2957, *slr2Δ*=YHUM2955, K=YHUM0463. B: Wachstumstest einer *kdx1Δ*- und einer *slr2Δ kdx1Δ*-Mutante im Σ 1278b-Hintergrund unter Kongorotstress. Die verschiedenen Mutanten wurden in Verdünnungsreihe (1/5) auf eine YPD- oder eine YPD-Platte + 100 μ g/ml Kongorot getropft. *kdx1Δ*=YHUM2963, *kdx1Δ slr2Δ*=YHUM2965, K=YHUM0463

Es zeigte sich, dass eine *wsc1Δ*-Mutante im Σ 1278b-Hintergrund sowohl auf Platten mit Caspofungin, als auch auf Platten mit Koffein wachsen konnte. Im Gegensatz dazu konnte dies die *wsc1Δ*-Mutante im S288C-Hintergrund nicht. Ließ man die *wsc1Δ*-Stämme auf Platten mit Kongorot wachsen, so war kein Unterschied festzustellen, die Mutanten in beiden Stammhintergründen zeigten kein Wachstum.

Fehlte allerdings nur Slt2, so konnten diese Mutanten im Σ 1278b Hintergrund auf Kongorot wachsen, während im S288C-Stamm kein Wachstum vorhanden war (Abbildung 25A).

Die Pseudokinase Kdx1, die ein Paralog zu Slt2 ist, kann nicht-katalytische Funktionen im CWI-Pathway übernehmen (Levin, 2011). Es sollte durch einen weiteren Tropftest geprüft werden, ob diese Kinase im Σ 1278b-Hintergrund für die Signalweiterleitung anstelle von Slt2 im CWI unter Kongorotstress verwendet werden könnte. Es zeigte sich allerdings, dass eine *kdx1Δ*- und eine *slt2Δ kdx1Δ*-Mutante ebenfalls, wie die Kontrolle, auf Kongorot-haltigen Platten wachsen konnte (Abbildung 25B).

Dieser Wachstumstest offenbarte somit deutliche Unterschiede zwischen den Stammhintergründen S288C und Σ 1278b bei der Stressverarbeitung. Dies könnte auf eine unterschiedliche Aktivierung des CWI und Weiterverarbeitung bei verschiedenen Stressen durch Wsc1 und Slt2 in beiden *S. cerevisiae*-Hintergründen hinweisen. Außerdem wird deutlich, dass Slt2 im Σ 1278b-Stamm bei der Kongorot-Resistenz keine Rolle zu spielen scheint.

Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges

Die Stämme im S288C-Hintergrund verhielten sich bei Zellwandstress-Exposition teilweise anders, als die im Σ 1278b-Hintergrund. Deshalb sollte geklärt werden, ob ebenfalls im CWI-Aktivierungsmuster unter Kongorot- und Caspofunginstress ein Unterschied zwischen beiden Stammhintergründen feststellbar ist, da die Wachstumsunterschiede auf einen Unterschied in der Aktivierung des CWI durch Wsc1 hinweisen könnten. Dafür wurde ein Slt2-Phosphorylierungs-Assay durchgeführt.

Die sich in der logarithmischen Phase befindlichen Stämme wurden zwei Stunden entweder Kongorot oder Caspofungin ausgesetzt und anschließend Proteine für eine Western Blot Analyse präpariert. Nach der Behandlung der Membran mit einem Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase-Antikörper bzw. einem Slt2-spezifischen Antikörper, konnte für die Stämme des S288C-Hintergrunds festgestellt werden, dass sich der Anteil an phosphoryliertem Slt2 in den Kulturen mit Zellwandstress sowohl in der Kontrolle, als auch im *wsc1Δ*-Stamm erhöhte (Abbildung 26B). Im Kontrollstamm erhöhte sich die Menge an Slt2-P relativ im Vergleich zur Kultur ohne Stresssubstanzen auf 1200 % (Kongorot) und 2700 % (Caspofungin). Dagegen war die Erhöhung im *wsc1Δ*-Stamm deutlich geringer. In der Kongorot Kultur erhöhte sich der phosphorylierte Teil auf ca. 400 %, gab man Caspofungin zu den Zellen, auf knapp 500 % (Abbildung 26B).

Setzte man eine *wsc1Δ*-Mutante des Σ 1278B-Hintergrunds dem Kongorotstress aus, war zu erkennen, dass diese eine relativ stark erhöhte Phosphorylierung von Slt2 bei diesem Stress aufwies und sich verglichen mit der Kontrolle nahezu verdoppelte. Setzte man die Σ 1278b-*wsc1Δ*-Mutante Caspofunginstress aus, war zu erkennen, dass die Menge an phosphoryliertem Slt2 unter Stress deutlich geringer war (500 %), als die Menge im Kontrollstamm (2000 %) (Abbildung 26D).

Diese Resultate zeigten, dass in den beiden Stammhintergründen die Aktivierung des CWI, bzw. die Phosphorylierung von Slt2 bei Caspofunginstress ein ähnliches Muster aufwies. Damit kann der zuvor

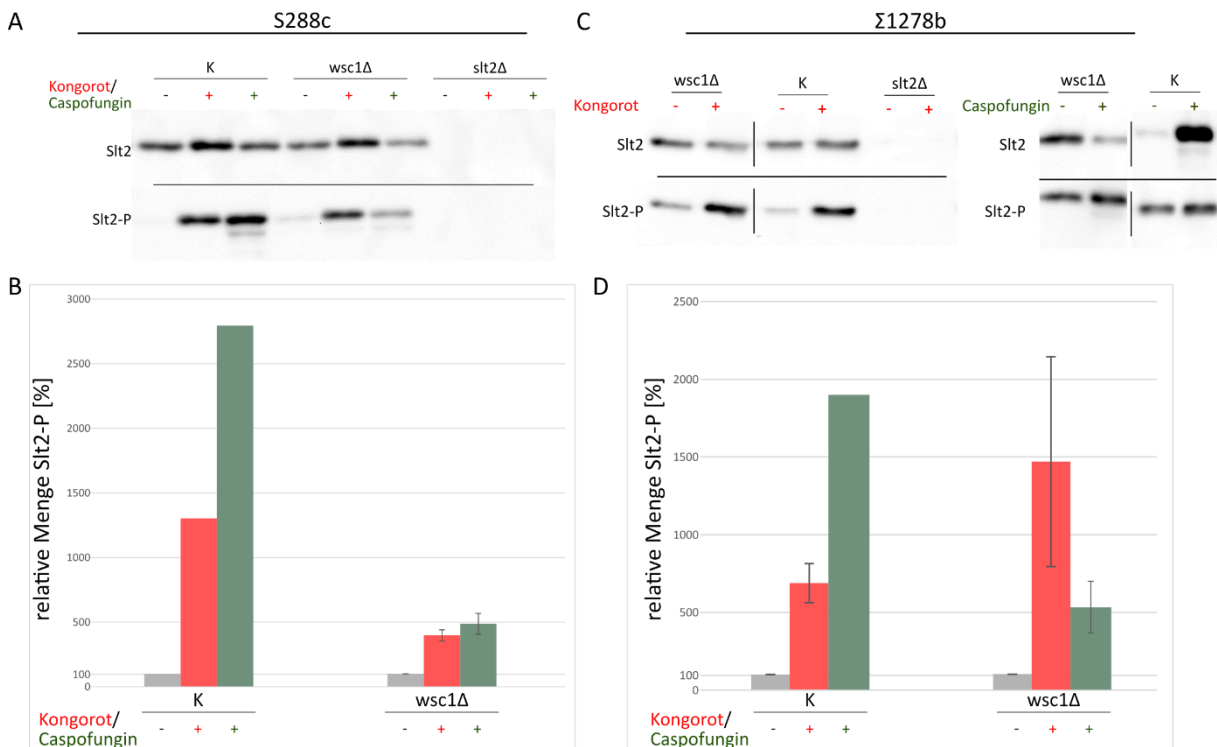


Abbildung 26: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Kongorot- und Caspofunginstress. A: S288C-Stämme: Beispielhafter Western Blot zu B. Die Stämme wurden zunächst in YPD bis zur logarithmischen Phase angezogen. Dabei wurden für jeden Stamm je Bedingung zwei Kulturen angesetzt. Anschließend wurde zu einer der beiden Kulturen 100 µg/ml Kongorot oder 0,5 µg/ml Caspofungin zugegeben und alle Kulturen weitere zwei Stunden inkubiert. Die Proteine wurden extrahiert und ein SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)-Antikörper detektiert. K= ESM356; wsc1Δ=YHUM2959/YHUM2960. B: Quantifizierung der Western Blots. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Es wurde für jede Mutante und die Kontrolle die Menge an Slt2-P ohne Stress auf 100 % gesetzt und die Menge bei Stress ist jeweils relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. B: Beispielhafte Western Blots zu C. Σ1278b-Stämme. Der Assay wurde wie bei A durchgeführt. K=YHUM0463; wsc1Δ=YHUM2957/2958. C: Die Quantifizierung erfolgte wie in B. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

festgestellte Wachstumsdefizit einer S288C-wsc1Δ-Mutante nicht über diese erklärt werden. Auch bei Kongorot kann das Wachstum der wsc1Δ-Mutanten nicht mit der Phosphorylierung von Slt2 korreliert werden, da sie beide nicht wachsen, aber Slt2 unterschiedliche Aktivierungsstärken aufweist.

Lokalisation der Transkriptionsfaktoren Rlm1 und SBF-Komplex

Anschließend sollte geprüft werden, ob es zwischen der Menge und Lokalisation der Transkriptionsfaktoren des CWI, Rlm1 und dem SBF-Komplex in den verschiedenen Stammhintergründen Unterschiede gibt. Rlm1 wird bei Zellwandstress durch eine Phosphorylierung aktiviert und reguliert Gene, die an der Zellwandbiogenese beteiligt sind (Watanabe *et al.*, 1997; Jung & Levin, 1999). Der SBF-Komplex besteht aus den beiden Proteinen Swi4 und Swi6 und wird, neben seiner hauptsächlichen Aufgabe als Regulator der Transkription während des Zellzyklus, auf eine nicht-katalytische Weise von Slt2 aktiviert (Kim & Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008).

Für die Untersuchungen wurden Rlm1, Swi4 und Swi6 mit einer mNeongreen-Markierung versehen und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Da die Lokalisation von den SBF-Komplex-Proteinen Swi4 und Swi6 Zellzyklus abhängig ist, wurden die Zellen hierfür mit Nocodazol synchronisiert. Die Zellen arretieren durch Nocodazol in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die Stämme wurden anschließend in der logarithmischen Phase mit entweder 100 µg/ml Kongorot oder 0,5 µg/ml Caspofungin behandelt, um festzustellen, ob diese Zellwandstresse verschiedenen Einfluss auf die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren haben.

Rlm1

Im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund konnte gezeigt werden, dass im Kontrollstamm sowohl bei 30 min und 90 min nach Zugabe der Zellwandgifte und bei allen getesteten Bedingungen Rlm1-NG im Zellkern und Zytoplasma lokalisierte. Deletierte man *WSC1*, war zu beobachten, dass sich die Lokalisation von Rlm1-NG bei beiden Zeitpunkten und bei allen Umgebungsbedingungen stark in den Zellkern verlagerte. Eine *slt2Δ*-Mutante dagegen zeigte sowohl bei Stress, als auch in ungestresster Umgebung eine undeutliche Rlm1-NG-Lokalisation in Kern und Zytoplasma.

Betrachtete man den Kontrollstamm im S288C-Hintergrund, war zu erkennen, dass in diesem Rlm1-NG im Zellkern lokalisierte. Diese Lokalisation war in einem *wsc1Δ*-Stamm sogar noch deutlicher wahrzunehmen, bei beiden Zeitpunkten und allen Bedingungen. Dagegen zeigte ein Stamm ohne *Slr2* eine eher uneindeutige Lokalisation von Rlm1-NG, welche sowohl auf Zellkern- und Zytoplasma hinweist.

Generell schienen die Zellen im S288C-Hintergrund mit Deletion von *WSC1* und *SLT2* anfälliger zu sein, vor allem nach 90 min waren viele tote Zellen zu erkennen. Auch beim *slt2Δ*-Stamm im $\Sigma 1278b$ Hintergrund waren mehr tote Zellen auszumachen, als in den vergleichbaren Kontrollen (Abbildung 27).

Swi4

Im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund war im Kontrollstamm unter allen Bedingungen und zu beiden Zeitpunkten keine eindeutige Lokalisation auszumachen. Swi4-NG lokalisierte sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma. Im *wsc1Δ*-Stamm konnte nach 90 min bei allen Bedingungen eine deutlichere Kernlokalisation von Swi4-NG wahrgenommen werden, es befand sich allerdings immer noch Protein im Zytoplasma. Fehlte *Slr2*, zeigte sich eine undeutliche Swi4-NG Lokalisation, die ebenfalls bei allen Bedingungen der Kontrolle glich.

Im Kontrollstamm des S288C-Hintergrundes konnte unter allen getesteten Bedingungen eine deutliche Kernlokalisation von Swi4-NG erkannt werden. Diese Swi4-NG Lokalisation war auch bei den *wsc1Δ*- und *slt2Δ*-Mutanten zu erkennen, wobei diese etwas undeutlicher wurde (Abbildung 28).

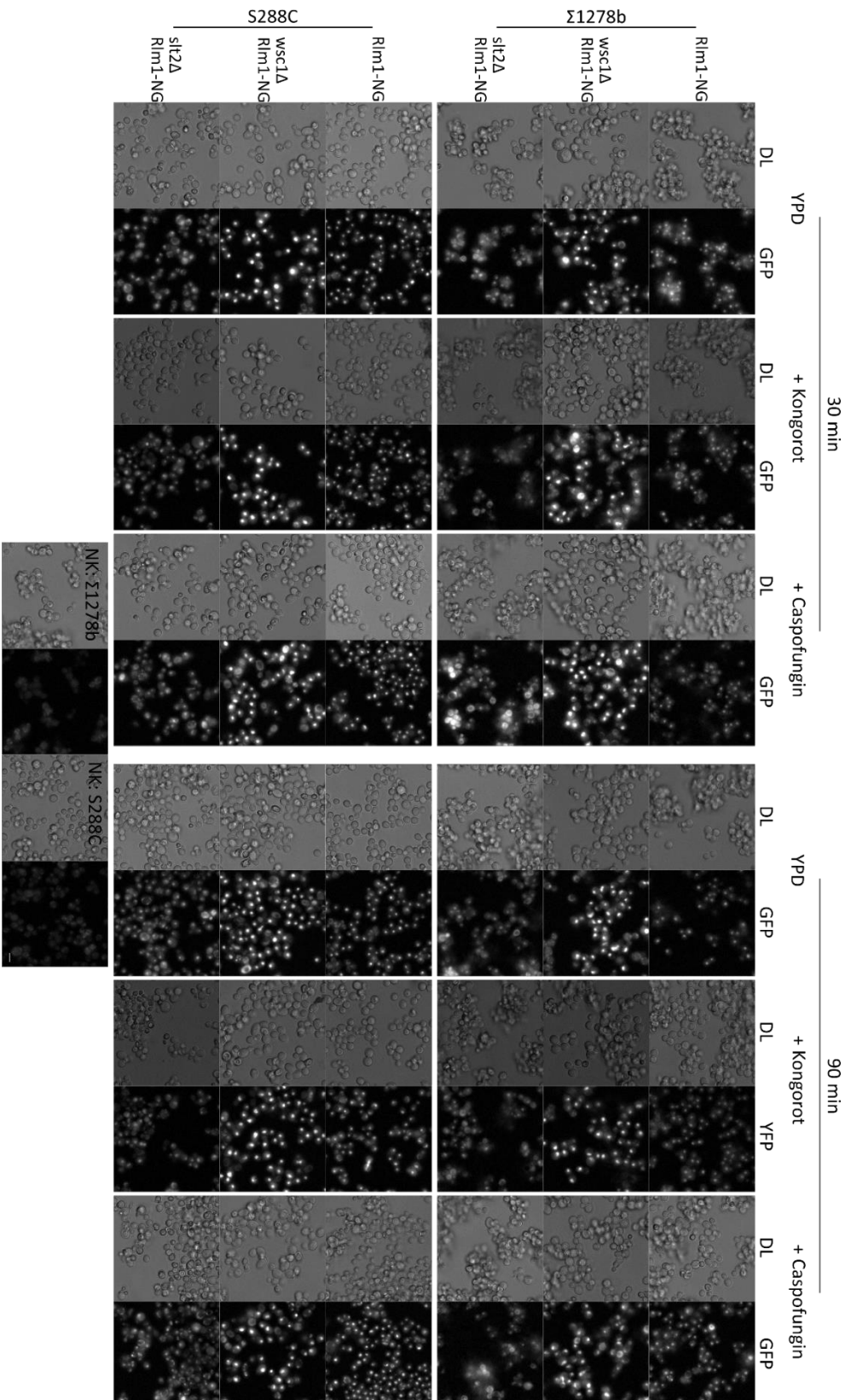


Abbildung 27 Lokalisation von Rlm1-NG im Σ 1278b und S288C Hintergrund. Für die Lokalisation wurden die Stämme in LFM angezogen und in der logarithmischen Phase mit Poly-L-Lysin an geklemmte Deckgläser fixiert und entweder LFM, LFM+ 100 μ g/ml Kongorot oder LFM+ 0,5 μ g/ml Caspofungin zugegeben. Nach 30 min und 90 min nach Zugabe wurden Bilder im GFP Kanal (Bildstapel) und im Durchlichtkanal gemacht. Gezeigt sind Z-Projektionen der GFP-Bildstapel. Der Größenmarker entspricht 5 μ m. S288C: Rlm1-NG=YHUM2973, wsc1Δ Rlm1-NG=YHUM2975, stl2Δ Rlm1-NG=YHUM2977, NK=ESM356, Σ 1278b: Rlm1-NG=YHUM2967, wsc1Δ Rlm1-NG=YHUM2969, stl2Δ Rlm1-NG=YHUM2971, NK=YHUM0463

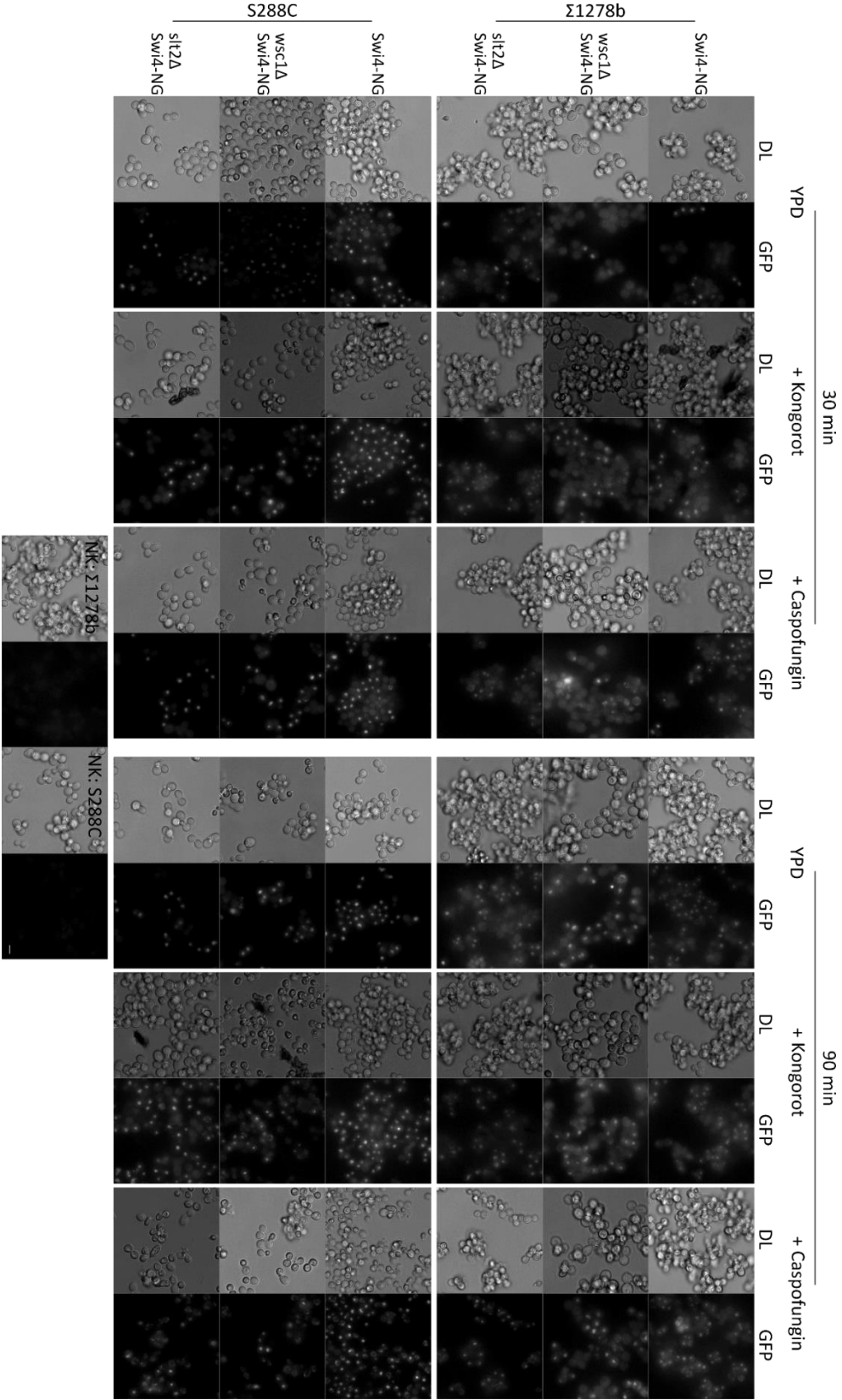


Abbildung 28: Lokalisation von Swi4-NG im Σ1278b und S288C Hintergrund. Für die Lokalisation wurden die Stämme in LFM angezogen und in der logarithmischen Phase 1,5 Stunden mit Nocodazol inkubiert und anschließend mit Poly-L-Lysin an gekammerte Deckgläser fixiert und entweder LFM, LFM+ 100 µg/ml Kongorot oder LFM+ 0,5 µg/ml Caspofungin zugegeben. Nach 30 min und 90 min nach Zugabe wurden Bilder im GFP Kanal (Bildstapel) und im Durchlichtkanal gemacht. Gezeigt sind Z-Projektionen der GFP-Bildstapel. Der Größenmarker entspricht 5 µm. S288C: Swi4-NG= YHUM2985, wsc1Δ Swi4-NG=YHUM2987, slt2Δ Swi4-NG=YHUM2989, NK=ESM356; Σ1278b: Swi4-NG=YHUM2979, wsc1Δ Swi4-NG=YHUM2981, slt2Δ Swi4-NG=YHUM2983, NK=YHUM0463

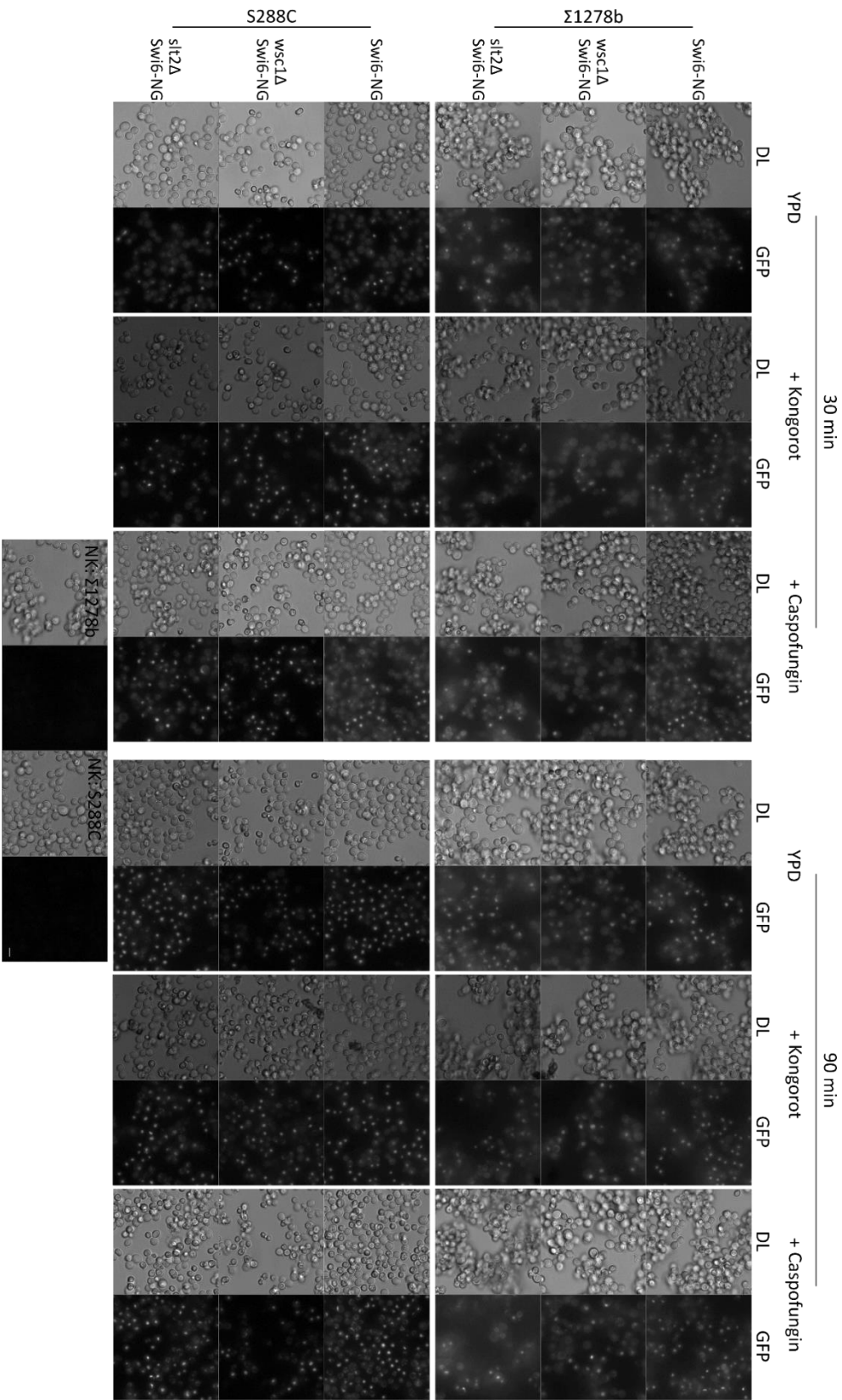


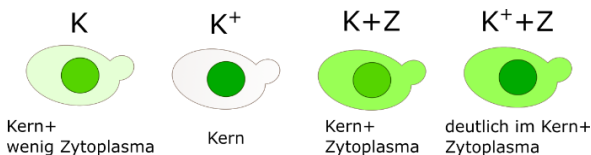
Abbildung 29: Lokalisation von Swi6-NG im $\Sigma 1278b$ und S288C Hintergrund. Für die Lokalisation wurden die Stämme in LFM angezogen und in der logarithmischen Phase 1,5 Stunden mit Nocodazol inkubiert und anschließend mit Poly-L-lysin an gekammerte Deckgläser fixiert und entweder LFM, LFM+ 100 $\mu g/ml$ Kongorot oder LFM+ 0,5 $\mu g/ml$ Caspofungin zugegeben. Nach 30 min und 90 min nach Zugabe wurden Bilder im GFP Kanal (Bildstapel) und im Durchlichtkanal gemacht. Gezeigt sind Z-Projektionen der GFP-Bildstapel. Der Größenmarker entspricht 5 μm . S288C: swi6-NG= YHUM2997, wsc1Δ swi6-NG=YHUM2999, slt2Δ swi6-NG=YHUM3001, NK=ESM356, $\Sigma 1278b$: swi6-NG=YHUM2991, wsc1Δ swi6-NG=YHUM2993, slt2Δ swi6-NG=YHUM2995, NK=YHUM0463

Swi6

Im $\Sigma 1278b$ -Stammbhintergrund konnte für Swi6-NG eine geteilte Lokalisation in Zellkern und Zytoplasma festgestellt werden, die unter Kongorotstress etwas undeutlicher wurde. Auch für den *wsc1Δ*-Stamm zeigte sich eine ähnliche Lokalisation für Swi6-NG, welche allerdings bei Caspofungin deutlicher im Zellkern wahrzunehmen war. Dagegen war Swi6-NG im *slt2Δ*-Stamm am deutlichsten unter ungestressten Bedingungen im Kern wahrzunehmen, wobei auch hier generell bei allen Bedingungen sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma Signal zu erkennen war.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Kontrolle des S288C-Stammbhintergrunds eine deutlichere Kernlokalisierung von Swi6-NG, vor allem nach 90 min. Diese war allerdings im *wsc1Δ*-Stamm weniger eindeutig, wenn dieser Caspofungin ausgesetzt war. Zellen ohne Slt2 zeigten eine deutliche Kern-Swi6-NG-Lokalisation unter allen Bedingungen (Abbildung 29).

Tabelle 2: Zusammenfassung der Lokalisationen von Rlm1, Swi4 und Swi6 unter Kongorot- und Caspofunginstress.



		-			Kongorot			Caspofungin		
		-	<i>wsc1Δ</i>	<i>slt2Δ</i>	-	<i>wsc1Δ</i>	<i>slt2Δ</i>	-	<i>wsc1Δ</i>	<i>slt2Δ</i>
Rlm1-NG	$\Sigma 1278b$	K+Z	K ⁺	K+Z	K+Z	K ⁺	K+Z	K+Z	K	K+Z
	S288C	K	K ⁺	K+Z	K	K ⁺	K+Z	K	K ⁺	K+Z
Swi4-NG	$\Sigma 1278b$	K+Z	K ⁺ +Z	K+Z	K+Z	K ⁺ +Z	K+Z	K+Z	K ⁺ +Z	K+Z
	S288C	K ⁺	K	K	K ⁺	K	K	K ⁺	K	K ⁺
Swi6-NG	$\Sigma 1278b$	K ⁺ +Z	K+Z	K ⁺ +Z	K+Z	K+Z	K+Z	K ⁺ +Z	K ⁺ +Z	K+Z
	S288C	K ⁺	K	K ⁺	K	K	K	K ⁺	K+Z	K ⁺

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sowohl die Abwesenheit von Wsc1 und Slt2, als auch die Anwesenheit von Zellwandstressoren und die Stammbhintergründe einen klaren Einfluss auf die Lokalisation der untersuchten Transkriptionsfaktoren hat. Dabei scheint im Falle von Rlm1 jedoch eher die Abwesenheit von *WSC1* und *SLT2* einen Einfluss auf die Lokalisation zu haben, als die verschiedenen Stresse oder Stammbhintergründe. Bei Swi4 und Swi6 dagegen scheinen die zwei unterschiedlichen Stammbhintergründe einen größeren Einfluss auf die jeweilige Lokalisation zu haben, als die Stresse oder die Deletionen. Eventuell weist dies auf einen Wsc1-spezifischen Einfluss auf Rlm1 hin und gibt einen Hinweis darauf, dass der SBF-Komplex in den beiden Stammbhintergründen unterschiedlich reguliert wird.

Untersuchung der Zellwandzusammensetzung

Da es beim Wachstum auf Caspofunginstress von *wsc1Δ*-Stämmen im Σ 1278b und S288C-Stammhintergrund deutliche Unterschiede gibt, sollte untersucht werden, ob es auch Abweichungen im Glucan- und Chitingehalt der untersuchten Mutanten unter Caspofungineinfluss gibt. Dafür wurden

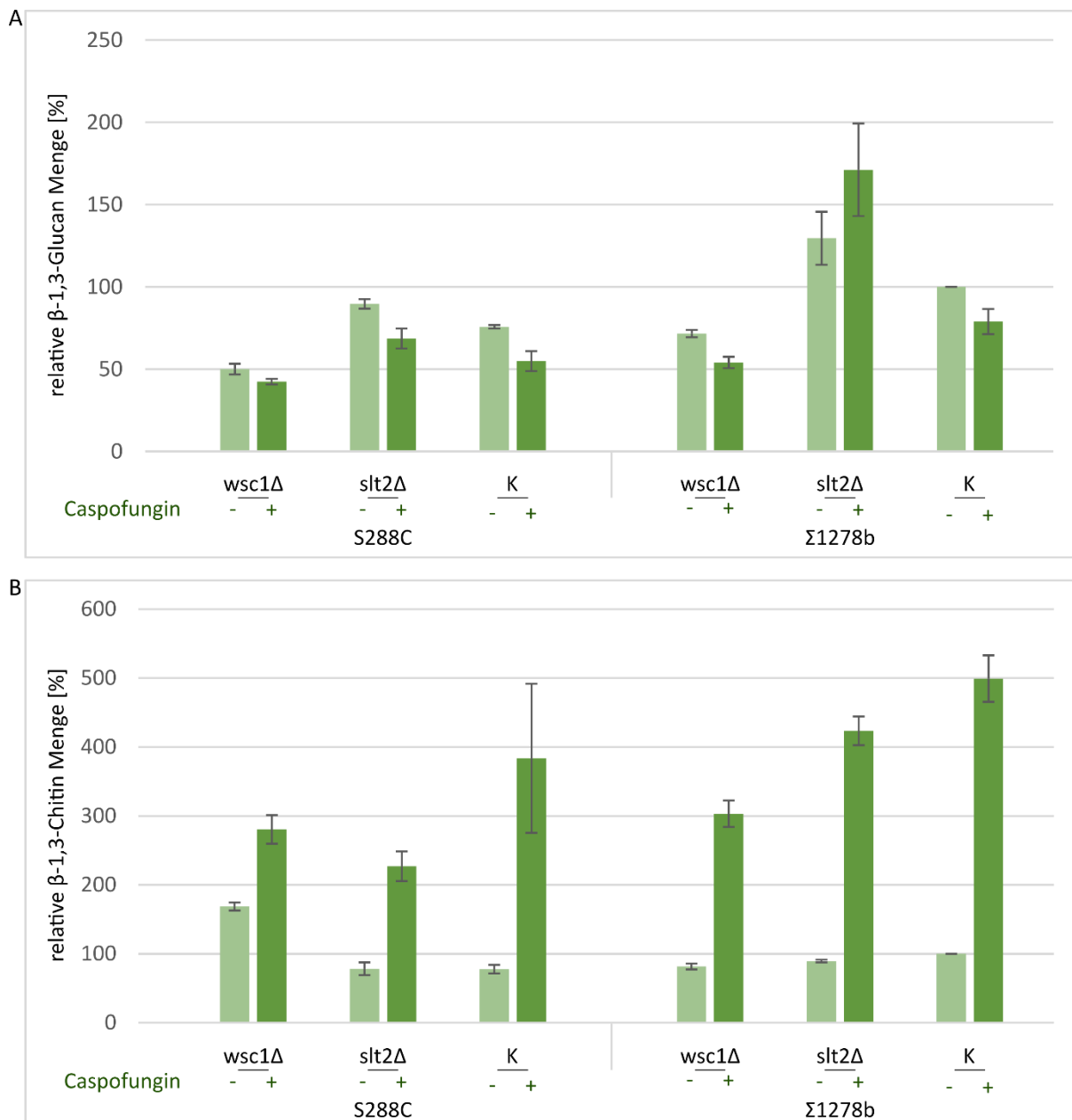


Abbildung 30: Untersuchung der β -1,3-Glucan- und Chitinmenge im Σ 1278b- und S288C-Stammhintergrund. Es wurden je Stammhintergrund *wsc1Δ*- und Kontrollstämme untersucht. Dafür wurden die Stämme über Nacht in SC-Medium angezogen und morgens 1/5 in neuem Medium verdünnt. Dabei wurden pro Stamm zwei Kulturen angelegt und in jeweils eine davon wurde 0,5 μ g/ml Caspofungin zugegeben. Die Kulturen inkubierten dann 5 h bei 30 °C schüttelnd und anschließend wurde die Zellmenge, welche 1 OD₆₀₀ entsprach, zweimal mit PBS gewaschen und mit Anilin- oder Trypanblau gefärbt. Für die Fluorimetermessung wurden für jeden Stamm zwei Klone zweimal gemessen. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler. A: β -1,3-Glucanmenge unter Caspofunginstress. Die gemessenen Werte für β -1,3-Glucan des Σ 1278b-Kontrollstammes ohne Caspofungin wurden auf 100 % gesetzt, die Werte der weiteren Stämme relativ dazu berechnet. B: Chitinmenge unter Caspofunginstress. Die gemessenen Werte für Chitin des Σ 1278b-Kontrollstammes ohne Caspofungin wurden auf 100 % gesetzt, die Werte der weiteren Stämme relativ dazu berechnet. S288C: *wsc1Δ*= YHUM2959/YHUM2960, *slt2Δ*=YHUM2961/YHUM2962, K=ESM356; Σ 1278b: *wsc1Δ*=YHUM2957/YHUM2958, *slt2Δ*= YHUM2955/YHUM2956, K=YHUM0463

die Zellen mit Anilinblau angefärbt und eine Fluoreszenzmessung am Fluorimeter durchgeführt. Dabei wurden die gemessenen Werte relativ zu den Werten des Kontrollstammes des $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrunds ohne Stresszugabe in Abbildung 30A dargestellt.

Der Glucangehalt der $\Sigma 1278b$ -Kontrolle nahm unter Caspofunginstress um ca. 20 % ab. Dies konnte auch für eine *wsc1Δ*-Mutante in diesem Stammhintergrund festgestellt werden, wobei hier generell weniger Glucan vorhanden war. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer *slt2Δ*-Mutante, dass sich in dieser die Glucanmenge erhöhte, was durch Zugabe von Caspofungin noch weiter gesteigert wurde.

Auch im Kontrollstamm des S288C-Stammhintergrunds konnte eine Abnahme der Glucanmenge bei Caspofunginzugabe beobachtet werden, allgemein enthielt dieser Stamm weniger Glucan, als der $\Sigma 1278b$ -Kontrollstamm. Auch im S288C-Stammhintergrund zeigte sich, dass bei einer Deletion von *SLT2* die Glucanmenge ohne Stresszugabe etwas höher ist als bei der Kontrolle. Die Menge nahm allerdings bei Zugabe von Caspofungin wieder ab. In einer S288C-*wsc1Δ*-Mutante konnte festgestellt werden, dass der Glucangehalt ohne Stress bereits auf die Hälfte verglichen mit dem Kontrollstamm des $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrunds sank. Durch Caspofunginzugabe wurde dieser noch weiter reduziert. Betrachtete man die Chitinmenge, welche durch Anfärben mit Trypanblau detektierbar wurde, konnte bei einem $\Sigma 1278b$ -Kontrollstamm gezeigt werden, dass durch Zugabe von Caspofungin eine deutliche Steigerung auf 500 % stattfand. Auch bei einer *slt2Δ*-Mutante fand diese Steigerung statt, allerdings etwas reduzierter, was sich ebenfalls im *wsc1Δ*-Stamm fortführte. Ein vergleichbares Muster konnte zudem im S288C-Stammhintergrund festgestellt werden. Dort steigerte sich die Menge an Chitin sowohl im Kontrollstamm bei Caspofunginstress, als auch im *slt2Δ*-Stamm in etwas reduzierter Form. Beim S288C-*wsc1Δ*-Stamm zeigte sich, dass die Chitinmenge schon im ungestressten Zustand erhöhte, was allerdings bei Caspofunginstress weiter gesteigert wurde (Abbildung 30B).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Reaktionen der Stämme beider Stammhintergründe auf Caspofungin bezüglich der Zellwandbestandteile ähneln. Generell ist etwas weniger Glucan im S288C-, als im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund vorhanden. Dies könnte auf eine dünnere Zellwand hindeuten. In beiden Stämmen scheint die Abwesenheit von *Slr2* zu einer Steigerung der Glucanmenge zu führen, wobei sich die Reaktionen auf Caspofungin dabei unterscheiden, was auf eine unterschiedliche Regulation der Glucansynthese bei Caspofunginstress hinweisen könnte. Die erhöhte Menge an Chitin im S288C-*wsc1Δ*-Stamm kann darauf hinweisen, dass diese schon ohne Caspofunginzugabe leichten Zellwandstress detektiert.

2.3 Struktur-basierte funktionelle Untersuchung der CRD-Domäne aus Wsc1

2.3.1 Herstellung von Wsc1-Varianten mit veränderten CRDs

Die Wsc- oder cysteinreiche Domäne (CRD) des Proteins Wsc1 ist essentiell für die Funktion des Sensors (Lodder *et al.*, 1999a). In einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit wurde die Struktur der *S. cerevisiae* Wsc1 CRD-Domäne, als erste pilzliche Struktur einer CRD, aufgeklärt (Schöppner, 2017). Auffallend an der Hefe-CRD Struktur war, dass sie einen kompakten Aufbau mit einem zentralen β -Faltblatt und einer α -Helix aufwies. Zudem war keine offensichtliche Bindetasche auszumachen. Jedoch sind einige exponierte aromatische Aminosäuren zu finden, welche auf Grund ihrer räumlichen Nähe in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt werden können und aromatische Aminosäuren der CRD-Domänen von Wsc1, Wsc2 und Wsc3 aus *S. cerevisiae* an diesen Positionen konserviert sind (Abbildung 31) (Schöppner, 2017). Daher sollte nun geklärt werden, ob diese Aminosäuren, ähnlich wie aromatische Aminosäurebänder in Flo11, wo diese homotypische Interaktionen vermitteln, essentiell für die Funktion von Wsc1 sind, da diese unter anderem von einer Gruppierung der Sensoren abhängen soll (Kraushaar *et al.*, 2015; Kock *et al.*, 2016).

In einem ersten Schritt wurden durch ortsspezifische Mutation die verschiedenen aromatischen Aminosäuren in den jeweiligen Gruppen durch Alanine ersetzt: Gruppe 1: Y22A Y24A Y107A, Gruppe 2: Y64A Y70A Y104A, Gruppe 3: Y41A W43A Y89A F91A Y93A. Zudem wurde ein weiteres Tryptophan an Position 60 durch Alanin ersetzt, da auch dieses in der Struktur leicht nach außen gerichtet ist. Als Negativkontrolle wurde zudem in einer Wsc1-Mutante die komplette CRD entfernt (Abbildung 31). Die Mutationen wurde nicht chromosomal im Hefegenom durchgeführt, sondern auf einem *CEN*-Plasmid (pRS314, Tabelle 15), welches ein mit einer *mNEONGREEN*-Markierung (NG) versehenes *WSC1*-Gen trug.

Die in dieser Weise mutierten Plasmide wurden dann in eine *wsc1Δ*-Mutante im Stammhintergrund S288C (*wsc1Δ*) eingebracht und die Lokalisation und Expression der Fusionsproteine durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen war zu erkennen, dass alle Fusionsproteine exprimiert wurden. Die ursprüngliche WSC1-NG Version zeigte dabei eine typische Wsc1-Lokalisation. Dies bedeutet, dass das Protein sowohl in der Zellwand zu erkennen war, als auch in erheblicher Menge im Zellinneren. Diese Lokalisation wurde bereits in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Masterarbeit für ein mit verschiedenen chromosomalen Fluoreszenzmarkierungen versehenes Wsc1-Protein festgestellt (Schmitz, 2016). Wurde Gruppe 1 (Y22A Y24A Y107A) und Gruppe 2 (Y64A Y70A Y104A) mutiert, oder die CRD (Δ CRD) entfernt, war deutlich mehr Protein im Zellinneren auszumachen, als bei Zellen mit WSC1-NG. Bei Gruppe 3 (Y41A W43A Y89A F91A Y93A) und bei Y60A-NG ähnelte die Lokalisation mehr der unmutierten Variante. Ebenso konnte gezeigt werden, dass im Kontrollstamm (WT) die WSC1-NG Version Wsc1-typisch lokalisierte (Abbildung 32A).

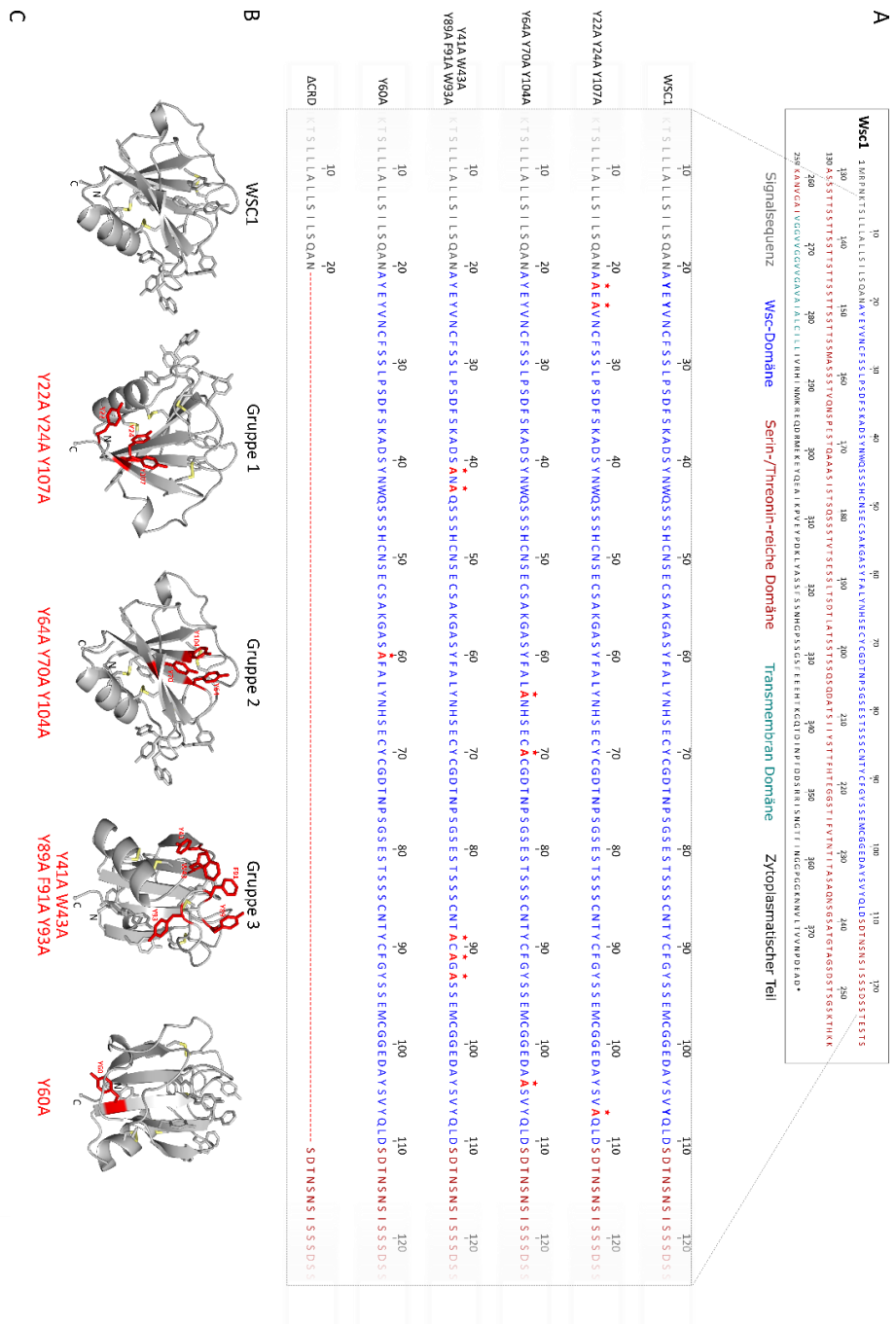


Abbildung 31: Sequenz und Struktur der Wsc-Domäne (CRD) von Wsc1. A: Sequenz von Wsc1 und der mutierten CRDs. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von Wsc1 mit den verschiedenen Domänen des Proteins. Außerdem ist die Sequenz der CRD in unmutierter Form (Wsc1) und die der mutierten Formen gezeigt. In Rot sind die Alanin-Reste markiert, welche die zu mutierenden Aromaten ersetzen sollten: Gruppe 1: Y22A Y24A Y107A; Gruppe 2: Y64A Y70A Y104A und Gruppe 3: Y41A W43A Y89A F91A W93A. Zusätzlich wird der Einzelaustausch von Y60A und ΔCRD, ohne Wsc-Domäne gezeigt. B: Struktur der CRD von Wsc1. In Gelb sind die Disulfidbrücken der Domäne gezeigt. Die Aromaten, welche ersetzt werden sollten, sind hier in Rot markiert. C=C-Terminus, N=N-Terminus. Strukturabbildung modifiziert nach Schöppner, 2017) C: Alignment der Wsc-Domänen von Wsc1, Wsc2 und Wsc3 aus *S. cerevisiae*. Die Konservierung wird durch dunkler werdende Farbe dargestellt. In Rot sind die in den Mutanten ausgetauschten aromatischen Aminosäuren gekennzeichnet. Das Sequenzalignment wurde mit Jalview 2.10.5 erstellt (Waterhouse *et al.*, 2009).

Damit zeigte sich, dass Mutationen in der CRD, oder das Fehlen der CRD einen Einfluss auf die Lokalisation der Wsc1-Sensoren haben. Dies könnte bereits ein Hinweis auf eine funktionelle Einschränkung der Sensoren sein.

2.3.2 Funktionelle Untersuchung der Wsc1-Varianten

Zellwachstum

Für eine funktionelle Untersuchung der verschiedenen Wsc1-Varianten wurden zunächst Wachstumstests unter Stressbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Stämme den Zellwandgiften Kongorot und Caspofungin ausgesetzt, da bekannt ist, dass einige Hefestämme ohne aktives *WSC1* nicht resistent gegen diese Stresse sind (Reinoso-Martín *et al.*, 2003; Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010).

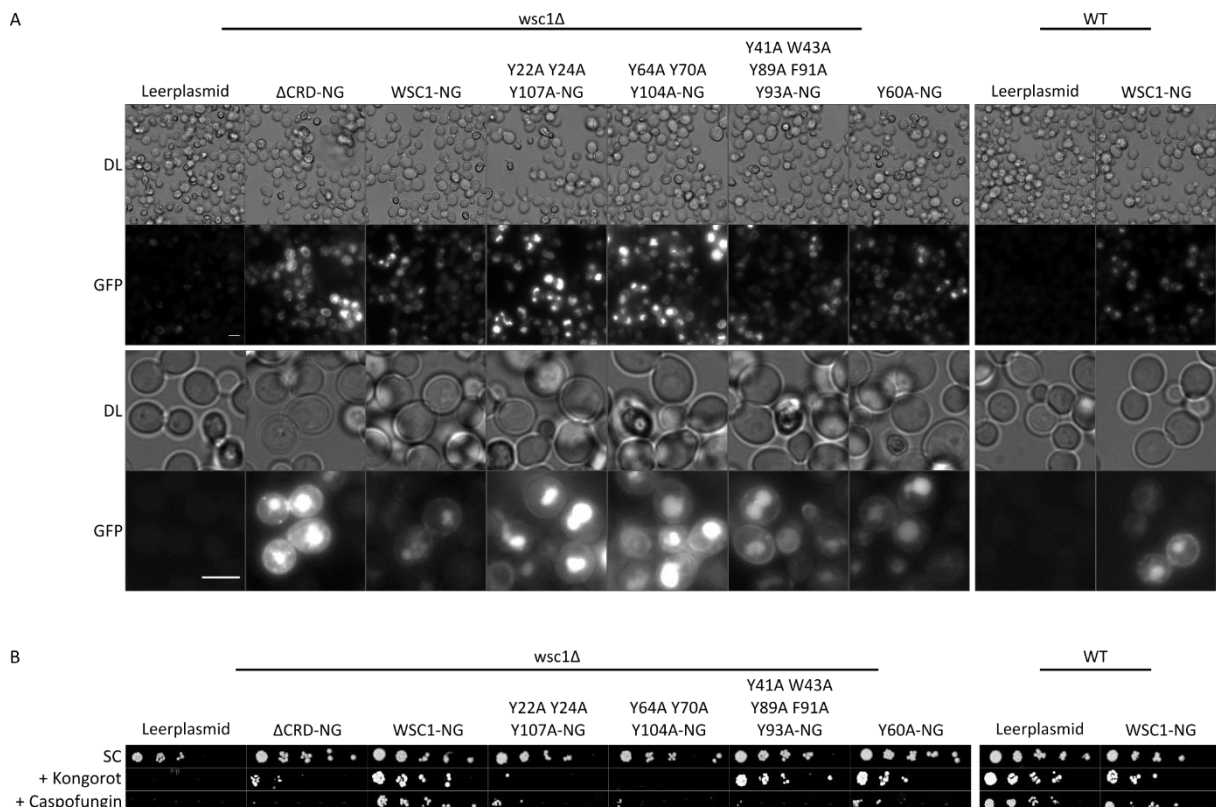


Abbildung 32: Phänotypische Untersuchung der CRD-Mutanten. A: Untersuchung der Expression von Wsc1 mit mutierten CRDs. Die Analyse der Expression wurde im S288C-Hintergrund durchgeführt. Eine *wsc1Δ*-Mutante wurde mit Plasmiden transformiert, welche die verschiedenen Wsc1-Varianten trugen. Diese waren zudem mit einer mNeongreen (NG) Markierung versehen. Die so entstandenen Stämme wurden in LFM-TRP angezogen und in der logarithmischen Phase im Durchlicht- und GFP-Kanal untersucht. Es wurden im GFP-Kanal Bildstapel angefertigt, gezeigt sind hier z-Projektionen (bearbeitet mit ImageJ). Die Aufnahmen wurden mit einem 63x Objektiv (oben) und einen 100x Objektiv (unten) gemacht. Die Belichtungszeit war bei allen Aufnahmen je Objektiv gleich. Der Größenmarker entspricht in beiden Fällen 5 µm. Leerplasmid=pRS314; *wsc1Δ*=YHUM2959, WT=ESM356. B: Wachstumstest auf verschiedenen Stressbedingungen. Es wurden die gleichen Stämme wie in A verwendet. Diese wurden in Verdünnungsreihe auf eine SC-TRP- oder eine SC-TRP-Platte + 100 µg/ml Kongorot oder 0,5 µg/ml Caspofungin getropft. Leerplasmid=pRS314; *wsc1Δ*=YHUM2959, WT=ESM356.

Beim Wachstum auf Agarplatten, die mit den Zellwandgiften versetzt waren (SC-TRP + 100 µg/ml Kongorot oder SC-TRP + 0,5 µg/ml Caspofungin), konnte gezeigt werden, dass eine Mutante ohne Wsc1 (*wsc1Δ* + Leerplasmid) nicht auf diesen wachsen konnten. Dagegen zeigten die Mutanten, die

Wsc1 mit unmutierter CRD exprimierten (*wsc1Δ* + WSC1-NG), auch bei Zellwandstresseinfluss ein mit den Kontrollen (WT) vergleichbares Wachstum.

Bei Kongorotexposition war erkennbar, dass Zellen, in denen in der CRD die Aminosäuren der Gruppe 1 und 2 zu Alanin mutiert waren, kein Wachstum zeigten. Zellen mit CRD-Mutationen in Gruppe 3 oder Y60 konnten dagegen auf Kongorot wachsen (Abbildung 32B). Wurden die verschiedenen Hefestämme Caspofungin ausgesetzt, konnte festgestellt werden, dass alle durchgeführten Mutationen in der CRD zu einer Wachstumseinschränkung führten.

Somit wurde hier deutlich gemacht, dass die aromatischen Aminosäuren eine Rolle bei der Wsc1 Funktion in der Zellwandstress-Wahrnehmung haben. Vor allem Wsc1-Proteine mit CRDs mit Mutationen in Gruppe 1 und 2 zeigten dabei eine starke Ähnlichkeit mit Sensoren ohne CRD, sowohl bei der Lokalisation, als auch in der Erkennung von Zellwandstress.

Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges

Um feststellen zu können, ob der Wachstumsdefekt der CRD-Mutanten bei Kongorotexposition auf eine Veränderung der Aktivierung des CWI zurückführbar ist, wurde ein Slt2-Phosphorylierungs-Assay unter Kongorotstress durchgeführt. Die verschiedenen Stämme wurden dafür zwei Stunden dem Stress Kongorot ausgesetzt und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Für die Auswertung wurden die quantifizierten Werte von Slt2-P mit den Werten von Slt2 normalisiert und je Mutante der errechnete Wert für die Kultur ohne Stress auf 100 % gesetzt, während die Werte für die Kulturen mit Kongorot relativ dazu berechnet wurden. Es war zu erkennen, dass in den Stämmen mit wildtypischer CRD (WSC1-NG, WT + Leerplasmid und WT + WSC1-NG) die Menge an phosphoryliertem Slt2 unter Kongorot-Stress auf 500 % bis 570 % im Vergleich zur auf 100 % gesetzten jeweiligen Kontrollkultur gestiegen war. In den Stämmen ohne Wsc1, oder mit mutierten CRD-Domänen war die Menge an phosphoryliertem Slt2 unter Kongorot-Stress im Vergleich etwas schwächer erhöht (ca. 400 %; Abbildung 33).

Dies bedeutet, dass Mutationen in der CRD oder die Abwesenheit der CRD einen Einfluss auf die Aktivierung des CWIs haben. Allerdings konnte dabei keine Korrelation zwischen einer verringerten Menge an phosphoryliertem Slt2 und den zuvor festgestellten Wachstumseinschränkungen festgestellt werden, da sich auch bei Mutationen in Gruppe 3 und Y60 eine Reduktion der Phosphorylierung zeigte. Die Stämme mit diesen Änderungen konnten allerdings bei Kongorotstress wachsen.

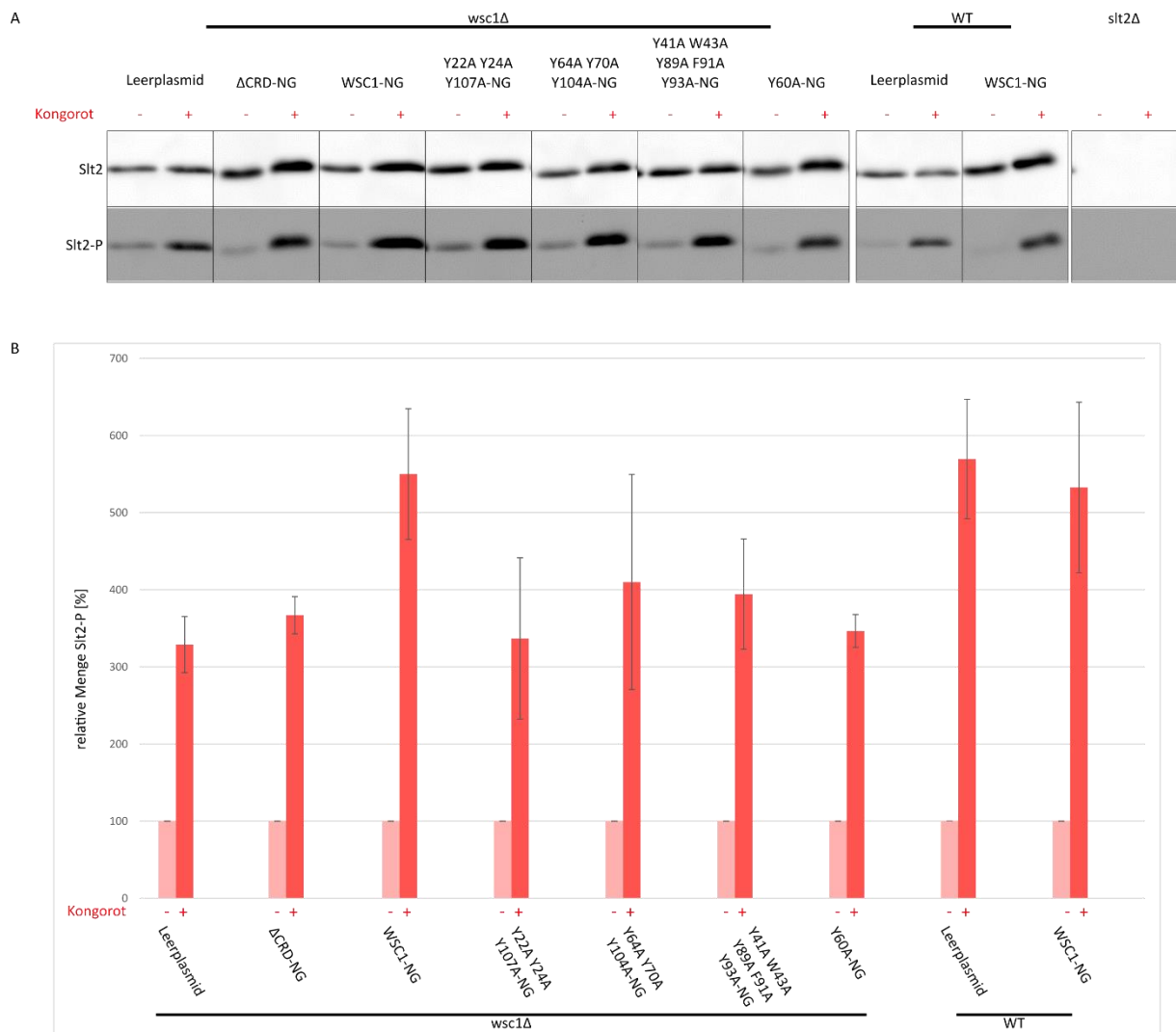


Abbildung 33: Slt2-Phosphorylierungsassay der CRD-Mutanten unter Kongorotstress. A: Beispielhafter Western Blot. Die Stämme wurden zunächst in SC-TRP bis zur logarithmischen Phase angezogen. Dabei wurden für jeden Stamm zwei Kulturen angesetzt. Anschließend wurde zu einer der beiden Kulturen 100 μ g/ml Kongorot zugegeben und alle Kulturen weitere zwei Stunden inkubiert. Die Proteine wurden extrahiert und ein SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Slt2 wurde mit einem Slt2-Antikörper, die Phosphorylierung mit einem anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)-Antikörper detektiert. Leerplasmid=pRS314; *wsc1Δ*=YHUM2959/YHUM2960, WT=ESM356. B: Quantifizierung der Western Blots. Es wurden je Stamm zwei Klone für die Western Blots verwendet und drei Western Blots für die Quantifizierung ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ. Das Resultat stellt den Quotienten aus P-Slt2 durch Slt2 dar. Es wurde für jede Mutante und die Kontrolle die Menge an Slt2-P ohne Stress auf 100 % gesetzt und die Menge bei Stress jeweils relativ dazu berechnet. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Zellwandzusammensetzung

Da das Wachstum auf Platten mit Caspofungin bei allen Mutanten stark eingeschränkt war (Abbildung 32B), sollte analysiert werden, ob durch die hemmende Wirkung von Caspofungin auf die Glucansynthase der Gehalt des Zellwandbestandteils β -1,3-Glucan der Mutanten Unterschiede im Vergleich zum Stamm mit unmutierter WSC1-Domäne oder den Wildtyp-Stämmen aufweist. Dafür wurden die Hefestämme mit mutierten CRDs und wildtypischen CRDs fünf Stunden Caspofungin ausgesetzt und anschließend über eine Anilinblau-Färbung der Glucangehalt bestimmt. Die Werte aller

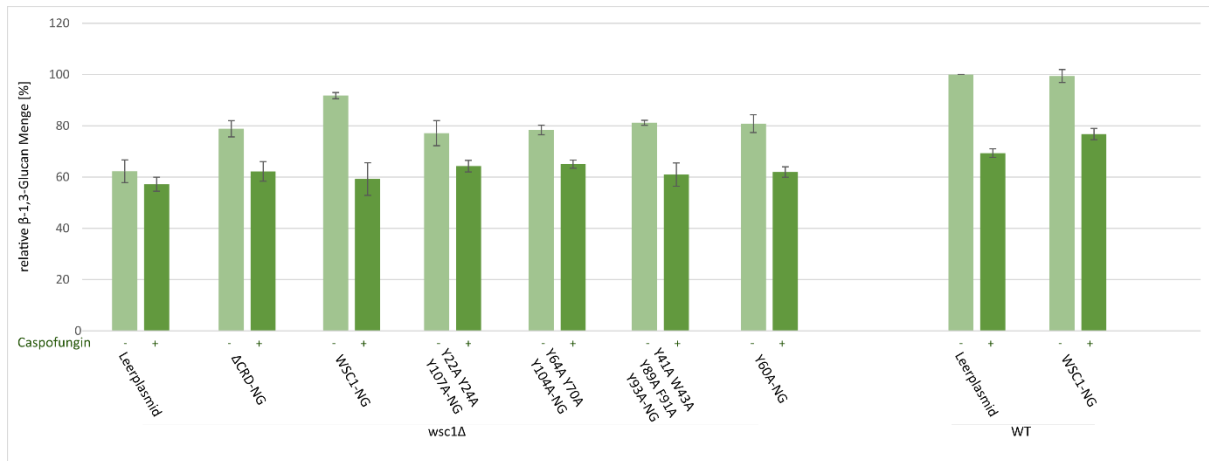


Abbildung 34: Analyse der β -1,3-Glucanmenge der Wsc1-Varianten unter Caspofungineinfluss. Die Zellen aus einer Übernachtskultur pro Stamm wurden entweder in SC Medium oder SC-Medium + 0,5 μ g/ml Caspofungin überführt. Nach 5-6 h wurden die Zellen angefärbt und im Fluorimeter gemessen. Es wurden je Mutante vier Klone gemessen. Die Ergebnisse sind je Stamm relativ zu dem Wert des Kontrollstammes mit Leerplasmid (WT + Leerplasmid) ohne Caspofungin dargestellt. Der Fehlerbalken entspricht dem Standardfehler Leerplasmid=pRS314; wsc1 Δ =YHUM2959/YHUM2960, WT=ESM356

Stämme wurden in Abbildung 34 relativ zu dem Glucangehalt einer Kontrolle (WT + Leerplasmid) bei ungestressten Bedingungen dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass in allen Stämmen mit unmutierter Wsc1-CRD eine vergleichbare Menge Glucan vorhanden war, die unter Caspofunginstress um ca. 30 % reduziert wurde. Fehlte Wsc1 komplett in den Zellen, so war die Glucanmenge auch unter der Normalbedingung ohne Caspofungin bereits verringert und eine Stresszugabe änderte sehr wenig an dieser. Waren in den Zellen Wsc1-Proteine ohne CRD oder mit mutierter CRD vorhanden, konnte festgestellt werden, dass die Glucanmenge um ca. 20 % reduziert war und eine Caspofunginzugabe diese Menge um weitere 20 % senkte.

Dies bedeutet, dass eine Mutation in der CRD von Wsc1 oder die Abwesenheit von Wsc1 zu einer verringerten Glucanmenge führt, was zu einer Wachstumseinschränkung führen kann. Allerdings waren die Werte der Glucanmenge unter Caspofunginstress bei allen untersuchten Stämmen, auch der Kontrollen, vergleichbar. Dies weist auf weitere Faktoren hin, die zu einem reduzierten Wachstum der Stämme bei Caspofunginstress führen.

3 Diskussion

In dieser Arbeit sollten die potentiellen Mechanosensoren des Zellwandintegritäts-Signalweges untersucht werden. Zu diesen zählen die Wsc-Proteine Wsc1, Wsc2 und Wsc3 und die Mid-Proteine Mid2 und Mtl1. Die Wsc-Sensoren zeichnen sich durch eine essentielle Kopfgruppe, der Wsc- oder Cystein-reichen Domäne (CRD) aus, die den Mid-Proteinen fehlt.

Es sollten zum einen alle Sensoren bezüglich ihrer Funktion analysiert werden, um festzustellen, ob sich eine Spezifität der Sensoren in *S. cerevisiae*-Zellen des Σ 1278b-Stammhintergrundes nachweisen lässt. Zum anderen sollte die CRD strukturspezifisch untersucht werden, um festzustellen, ob einzelne exponierte Aminosäuren entscheidend für die Sensorfunktion sind.

3.1 Untersuchung der Spezifität einzelner Sensoren unter verschiedenen Bedingungen

In der Literatur sind zur Wsc- und Mid-Sensorfamilie aus *S. cerevisiae* viele Informationen verfügbar. Trotz allem ist nicht klar, warum sich die Hefe fünf dieser ähnlichen Proteine im Genom erhalten hat. Es wird einerseits angenommen, dass es sich um Reserveproteine handeln könnte, die einspringen, wenn ein anderes durch z.B. Mutationen unbrauchbar wird (Wilk *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu wird andererseits vermutet, dass die einzelnen Sensoren spezifische Aufgaben haben. Unter anderem wird angedeutet, dass die Sensoren durch die verschiedenen Längen der Serin-/Threonin-reichen Domänen verschiedene Signale in unterschiedlichen Bereichen der Zellwand erkennen könnten (Rodicio & Heinisch, 2010).

Den beiden Sensoren Wsc1 und Mid2 wird dabei die größte Wichtigkeit der Familie zugewiesen und sowohl überlappende, als auch spezifische Funktionen beider Proteine beschrieben. Beide sollen Zellwandstresse erkennen, Wsc1 wird jedoch zusätzlich eine Rolle in der Temperatursensibilität zugeschrieben, während Mid2 bei der Pheromon-Erkennung beteiligt sein könnte. Eine Doppel-Deletionsmutante der beiden Sensorgene soll zudem nicht in der Lage sein, ohne osmotischen Stabilisator zu wachsen (Levin, 2011; Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde nun weiter untersucht, ob sich eine Funktionsspezifität der Sensoren ausmachen lässt. Dafür wurde nicht, wie in zahlreichen vorherigen Arbeiten, mit Einzel- oder Doppel-Deletionsmutanten gearbeitet, sondern mit Mutanten, in denen nur noch eines, bzw. keines der Sensorproteine vorhanden war. Dies sollte den Vorteil bringen, bestimmte Phänotypen einem Sensor zuzuweisen, ohne dass andere noch vorhandene Proteine der Familie einen Einfluss darauf nehmen können.

Herstellung der Stammsets

In einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Masterarbeit wurde festgestellt, dass die Sensoren in sehr unterschiedlichen Mengen in der Zelle vorkommen. Dabei waren Wsc1 und Mid2 die Proteine mit der größten gemessenen Proteinmenge im Vergleich zu den anderen Sensoren (Schmitz, 2016). Dies spiegelt die Wichtigkeit von Wsc1 und Mid2 bei der Signalerkennung wider. Um die Mengenunterschiede der Sensoren für die experimentellen Untersuchungen zu umgehen, wurden in einem Stammset die natürlichen Promotoren jeweils durch den gleichen starken, konstitutiven Promotor ersetzt. Die erhoffte Angleichung der Proteinmenge der fünf Sensoren konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Unterschiede der Proteinmengen entsprachen ungefähr denen in den Stämmen mit natürlichem Promotor. Dies kann für eine post-transkriptionelle, oder -translationale Kontrolle der Sensormenge in der Zelle sprechen. Für eine posttranslationale Kontrolle der Sensormenge spricht, dass für Mtl1, welches in geringster Menge in den Zellen vorhanden zu sein scheint, eine höhere Proteininstabilität im Vergleich zu den anderen Sensoren gemessen wurde. Generell wurde für die weiteren Proteine eine sehr hohe Stabilität gemessen. Dabei schien Wsc1 stabiler als Mid2 zu sein. Dies widerspricht allerdings der Literatur, die für Wsc1 eine Halbwertszeit von ca. 5 h angibt, während für Mid2 eine Halbwertszeit von ca. 19 h aufgezeigt wurde (Christiano *et al.*, 2014). Diese Daten würden zu der geringeren Menge an gemessenem Wsc1-Protein passen, während die in dieser Arbeit erlangten Resultate dem widersprechen. Es ist möglich, dass diese Unterschiede durch die Verschiedenheit der Stammhintergründe zu Stande kommen, da die in der Literatur erlangten Ergebnisse nicht in einem $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund gewonnen wurden (Christiano *et al.*, 2014). Eine post-transkriptionelle Regulation der Sensoren könnte über eine Analyse der in den Zellen vorhandenen mRNAs, z.B. durch „Real-Time-PCR“, untersucht werden.

Generell waren jedoch die Proteinmengen der Sensoren mit ausgetauschtem Promoter im Vergleich zu den Varianten mit natürlichem Promotor in allen Fällen erhöht. Somit konnten die Mutanten verwendet werden, um die Auswirkung einer Überexpression der Sensoren auf verschiedenste Phänotypen zu analysieren. Auffällig war, dass in den Einzelsensormutanten mit aktiven Wsc3-, Mid2- oder Mtl1- Sensor mit natürlichem Promotor die Menge an Protein im Vergleich zum Kontrollstamm mit allen vorhandenen Sensoren erhöht war. Dies könnte eventuell ein Anzeichen für eine gegenseitige Regulation der Sensoren durch Wsc1 oder auch Wsc2 sein, da diese keine Erhöhung ihrer Proteinmenge zeigten. Dafür könnte auch sprechen, dass für Wsc1 Interaktionen zu allen weiteren Wsc- und Mid-Proteinen publiziert sind und auch Wsc2 mit Wsc3 und Mid2 interagieren soll (Ketela *et al.*, 1999; Verna, J. *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2013). Möglich ist zudem, dass Wsc1 und Wsc2 Transkriptionsfaktoren beeinflussen, welche die anderen Sensoren steuern. Dies könnte z.B. durch Untersuchungen der Proteinmengen in *wsc1Δ*- oder *wsc2Δ*-Stämmen weiter analysiert werden.

Eine Überexpression der Sensorproteine, oder das Fehlen der anderen Sensoren hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine. Für alle war eine Lokalisation zu erkennen, die den Zellen in einem wildtypischen Stamm entsprachen und die auch durch frühere Arbeiten bestätigt wurden (Wilk *et al.*, 2010; Straede & Heinisch, 2007a; Schmitz, 2016). Alle Sensoren sind in der Zellperipherie lokalisiert. Wsc1 zeigt zudem eine deutliche Lokalisation der Fusionsproteine im Zellinneren, was durch ein reges und für die Funktion essentielles Recycling des Sensors über Endozytose erklärt werden kann (Piao *et al.*, 2007). Auch Wsc2 wird durch Endozytose recycelt, jedoch über ein anderes Signal (Wilk *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu Wsc1, ist für Wsc2 in dieser Arbeit und einer Masterarbeit zwar Signal im Zytoplasma detektierbar, jedoch nicht so eindeutig wie bei Wsc1 (Schmitz, 2016). Allerdings zeigten Wilk *et al.* eine deutlich dem Wsc1-Signal ähnelnde vakuoläre Lokalisation von Wsc2-GFP (Wilk *et al.*, 2010). Auch für Wsc3 und Mtl1 waren in dieser Arbeit Signale, welche einer Lokalisation in der Vakuole ähneln, erkennbar. Dies könnte ebenfalls für eine funktionelle Endozytose bzw. ein Recycling dieser Sensoren sprechen. Einzig Mid2 zeigte in dieser und vorherigen Arbeiten keine vergleichbare zytoplasmatische Lokalisation (Straede & Heinisch, 2007a). Die verschiedenen Endozytosewege und das scheinbar nicht vorhandene Recycling von Mid2 könnten weitere Hinweise für spezifische Funktionen der Sensoren sein.

Wachstum der Stämme unter stressfreien Bedingungen

Auffällig war, dass alle in dieser Arbeit hergestellten Hefestämme im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund, auch die, die keinen Sensor mehr trugen, ohne osmotischen Stabilisator unter stressfreien Bedingungen wachsen konnten. Somit sind die Sensoren unter diesen Bedingungen nicht essentiell. Dies widerspricht einigen zuvor erwähnten publizierten Daten, die angeben, dass bereits eine *wsc1 Δ mid2 Δ* -Mutante Wachstumseinschränkungen aufweisen soll (Levin, 2011). Dies gab erneut einen Hinweis darauf, dass Unterschiede bezüglich des CWI oder der Zellwandstabilität zwischen verschiedenen *S. cerevisiae*-Stammhintergründen erkennbar sind.

Zudem war überraschenderweise feststellbar, dass Hefestämme ohne Wsc- und Mid-Sensoren den CWI aktivieren konnten, bzw. die Phosphorylierung von Slt2 möglich war und auch ohne zusätzlichen Stress deutlich in den Mutanten zunahm. Es zeigte sich, dass in den Einzel-Sensormutanten oder in einer Mutante ohne Wsc- oder Mid-Proteine die Menge an phosphoryliertem Slt2 bereits unter nicht gestressten Bedingungen deutlich erhöht war. Mit Ausnahme des WSC1-Stammes, stieg diese auf relativ 150 % bis 350 %. Dies bedeutet, dass in den Zellen ohne Wsc1 eine verstärkte Aktivierung des CWI ohne Stress stattfindet. Es ist zwar bekannt, dass auch unter Normalbedingungen eine basale Aktivität des CWI vorhanden ist, allerdings ist eine starke Steigerung der Slt2-Phosphorylierung ohne Stress ungewöhnlich (Dichtl *et al.*, 2016). Dies könnte zum einen an der reduzierten β -1,3-Glucanmenge in den Mutanten liegen, was zu einem internen Zellwandstress in den Stämmen führen

könnte. Dagegen spricht allerdings die relativ gleich bleibende Menge an Chitin, welche laut verschiedener Publikationen bei Zellwandstress-Mutanten erhöht ist (Levin, 2011). Zudem bleibt zu klären, warum die gesteigerte Slt2-Phosphorylierung nicht zu einer Steigerung der Glucanmenge führte, wie es zu erwarten gewesen wäre. Generell weisen diese Resultate darauf hin, dass der CWI, bzw. die Kinase Slt2, nicht nur durch die Wsc- und Mid-Sensoren aktiviert werden können. Es müssen vermutlich andere Sensoren oder Proteine an der Erkennung von z.B. internem Zellwandstress beteiligt sein (Abbildung 35).

Erkennung verschiedener Stresse durch einzelne Sensoren

Deutlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Sensoren von der Zelle zur Erkennung von Zellwand- oder -membranstress benötigt werden und nicht zur Erkennung anderer getesteter Signale. Die Mutanten mit nur einem, oder keinem Sensor zeigten keine Wachstumseinschränkung, wenn sie DNA-, reduktivem oder Aminosäurestress ausgesetzt waren.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst (Tabelle 3). Dabei wird auf die verschiedenen Phänotypen unter den untersuchten Bedingungen eingegangen, die folgend diskutiert werden.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Phänotypen der untersuchten Stämme. Es sind die Ergebnisse der Untersuchungen aus Teil 2.1 zu Zellwachstum, Zellviabilität, Slt2-Phosphorylierung und Zellwandzusammensetzung dargestellt. Die Resultate der verschiedenen Stämme sind dabei relativ zu den Phänotypen des Kontrollstammes mit allen Sensoren beschrieben. +=vorhandenes Signal, bzw. gesteigertes Signal; -=abnehmendes Signal; Erklärung des Farbcodes in folgender Tabelle 4.

Stamm		Wachstumsbedingungen							
		YPD/SC	+ Caspofungin	+ Kongorot	+ EtOH	+ Koffein	+ DTT	+ 3-AT	+ MMS
alle 5 Sensoren (K)	Zellwachstum	++	++	++	+	+	++	++	++
	Zellviabilität	++	++	++	+	++			
	Slt2-Phosphorylierung	+	+++	++		++			
	Glucangehalt	+	-						
	Chitingehalt	+	+++						
-5	Zellwachstum								
	Zellviabilität								
	Slt2-Phosphorylierung								
	Glucangehalt								
	Chitingehalt								
WSC1	Zellwachstum								
	Zellviabilität								
	Slt2-Phosphorylierung								
	Glucangehalt								
	Chitingehalt								

Stamm		Wachstumsbedingungen						
WSC2	Zellwachstum							
	Zellviabilität							
	Slt2-Phosphorylierung							
	Glucangehalt							
	Chitingehalt							
WSC3	Zellwachstum							
	Zellviabilität							
	Slt2-Phosphorylierung							
	Glucangehalt							
	Chitingehalt							
MID2	Zellwachstum							
	Zellviabilität							
	Slt2-Phosphorylierung							
	Glucangehalt							
	Chitingehalt							
MTL1	Zellwachstum							
	Zellviabilität							
	Slt2-Phosphorylierung							
	Glucangehalt							
	Chitingehalt							
wsc1Δ	Zellwachstum							
	Zellviabilität							
	Slt2-Phosphorylierung							
	Glucangehalt							
	Chitingehalt							

Tabelle 4: Erklärung des Farbcodes zu Tabelle 3

Zellwachstum	Zellviabilität	Slt2-Phosphorylierung	Glucangehalt/ Chitingehalt	
	≥160 % *	≥160 % *	≥160 % *	
	130 %-160 % *	130 %-160 % *	130 %-160 % *	
	110 %-130 % *	110 %-130 % *	110 %-130 % *	
vergleichbar mit Kontrolle	vergleichbar mit Kontrolle (+/- 10 %) *	vergleichbar mit Kontrolle (+/- 10 %) *	vergleichbar mit Kontrolle (+/- 10 %) *	
	60-90 % *	60-90 % *	60-90 % *	
	30-60 % *	30-60 % *	30-60 % *	
	≤30 % *	≤30 % *	≤30 % *	
kein Wachstum	-	-	-	
	* im Vergleich zum Kontrollstamm zur gleichen Bedingung	* Verhältnis zw. Wert der Slt2-Phosphorylierung mit und ohne Stress der Mutanten im Vergleich zum gleichen Wert des Kontrollstammes	* im Vergleich zum Kontrollstamm zur gleichen Bedingung	

Membranstress

Setzte man die Stämme Membranstress durch Ethanol aus, waren Wachstumseinschränkungen erkennbar. Ethanol beeinträchtigt zwar nicht die Zellwand, aber es soll eine Permeabilisierung der Plasmamembran begünstigen (Marza *et al.*, 2002). Durch die Verankerung der Sensoren in der Zellmembran, ist es denkbar, dass die Sensoren diese Beeinflussung der Membran wahrnehmen und die weiterführende Signalkaskade aktivieren und somit Membranstress detektieren könnten. Es war zu erkennen, dass die Zellen mit Wsc1 in der Lage waren trotz Ethanolstress zu wachsen, sie waren allerdings stark eingeschränkt. Wie bereits publiziert, schienen alle Mutanten ohne aktives Wsc1 zunächst kein Wachstum zu zeigen (Auesukaree *et al.*, 2009). Jedoch konnte dieser Phänotyp durch Überexpression von WSC2, WSC3 und MID2 komplementiert werden. Es wurde zudem gezeigt, dass eine Überexpression von WSC1 den Zellen die gleiche Überlebenschance wie einem wildtypischen Stamm bei längerem Ethanol-Einwirken einräumt. Wurde WSC2 überexprimiert, hatten die Zellen sogar eine höhere Überlebensrate als die eines wildtypischen Stammes. Dagegen wurde durch Anwesenheit oder Überexpression der anderen Sensoren kein Vorteil gemessen. Interessanterweise zeigten die Mutanten mit überexprimiertem WSC3 und MID2 ein besseres Wachstum auf festem Medium mit Ethanol, jedoch war die generelle Überlebensrate vergleichbar mit den Mutanten mit natürlichem Promotor. Es ist unklar, warum die Zellen mit gesteigerter Wsc3- und Mid2-Proteinmenge auf Platten mit Ethanol, trotz gleichbleibender Überlebensrate besser wachsen können. Eventuell ist der Selektionsdruck durch den Stress auf Festmedium geringer, als in der flüssigen Kultur.

Generell lässt sich sagen, dass die Sensoren, zwar teilweise nur mit gesteigerter Proteinmenge, Membranstress detektieren. Dabei lässt sich eine leichte Spezifität von Wsc1 für die Erkennung von Membranstress ausmachen.

Wachstum unter Koffeineinfluss

Ein ähnliches Verhalten der Mutanten war auszumachen, wenn die untersuchten Stämme unter dem Einfluss der Substanz Kongorot standen. Allerdings zeigten alle Mutanten mit einzelnen Sensoren mit natürlichem Promotor kein Wachstum. Erst durch die Überexpression der Sensoren, konnte eine Resistenz gegen Koffein erreicht werden. Eine erhöhte Menge an Wsc1 und Wsc2 verursachte auch hier eine gesteigerte Überlebenschance bei Anwesenheit von Koffein, für Wsc3 und Mid2 ergab sich dieselbe gleichbleibende Menge an überlebenden Zellen, wie es auch bei Ethanol zu beobachten war. Bei Koffein ist unbekannt, warum es den CWI aktiviert, da es nicht als klassischer Zellwandstress gilt (Levin, 2011). Es ist bekannt, dass Mutanten, denen WSC1 und/oder MID2 fehlen, Koffein-sensitiv sind, sie jedoch keine Einschränkung der CWI-Aktivierung aufweisen (Kuranda *et al.*, 2006b). Dies konnte durch diese Arbeit für die Mutanten mit überexprimierten Sensoren bestätigt werden. Die Mutanten mit ADH-Promotor-versehenen Sensoren zeigten in der Kontrolle ähnliches Muster der Slr2-

Phosphorylierung. Dabei war nur in P-WSC3 eine leichte Erhöhung der Menge an phosphoryliertem Slt2 erkennbar. Die Stämme mit natürlichem Promotor zeigten teilweise eine starke Erhöhung der Slt2-Phosphorylierung unter Koffein-Einfluss. Jedoch kann man eine zu hohe Menge an aktiviertem Slt2 nicht in Verbindung mit den Wachstumseinschränkungen bringen, da z.B. ein Stamm ohne Sensoren eine ähnliche Menge an phosphoryliertem Slt2 wie die Kontrolle aufwies. Die Stämme WSC1 und WSC2 wiesen die stärkste Aktivierung des CWI auf, was darauf hindeuten könnte, dass sie diesen Stress erkennen können. Da selbst eine starke Phosphorylierung von Slt2 in den Einzel-Sensormutanten nicht ausreicht, um eine Resistenz gegenüber Koffein zu vermitteln, wäre es möglich, dass mehrere Sensoren benötigt werden, um eine ausreichende Zellantwort zu erreichen.

Die starke Aktivierung der Slt2-Kinase bei Koffeinstress und damit des CWIs, soll von der Kinase Tor1 abhängen. Ist diese deletiert, nimmt die Menge an phosphoryliertem Slt2 ab (Kuranda *et al.*, 2006b). Eine *tor1Δ*-Mutante zeigte eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Koffein, wie es auch für Komponenten des CWI gezeigt wurde, wobei dieser Phänotyp im Gegensatz dazu nicht durch osmotische Stabilisierung mit Sorbitol gerettet werden konnte. Gezeigt wurde zudem, dass eine Phosphorylierung von Slt2 bei Koffeinstress nicht abhängig von den Sensoren Wsc1 und Mid2 war (Kuranda *et al.*, 2006b). Es wurde vermutet, dass eine Aktivierung des CWI zufällig, als Nebeneffekt geschieht und dass CWI-Mutanten aufgrund ihrer geschwächten Zellwand Wachstumseinschränkungen bei Koffein aufzeigen, da in Koffein-behandelten Zellen die Zellwandzusammensetzung verändert sein soll. Das Hauptziel des Koffeinstresses soll aber der TOR-Signalweg sein (Kuranda *et al.*, 2006b).

Eine Aktivierung des CWI bei Koffeineinfluss, die nur indirekt durch eine allgemeine Schwächung der Zellwand ausgelöst wird, könnte auch die Phosphorylierungsmuster und das Wachstumsverhalten der hier untersuchten Mutanten erklären. Durch eine Überexpression der Sensoren könnte eine höhere Zellwandintegrität gegeben sein. Für Wsc1 und Wsc2 wurde zudem aufgezeigt, dass ihre Anwesenheit einen generellen Wachstumsvorteil mit sich bringt (Wilk *et al.*, 2010). Damit könnte es zu einer Reduzierung der Zellwandstress-bedingten Phosphorylierung von Slt2 in den überexprimierten Sensor-Mutanten kommen, zum Wachstum auf Medium mit Koffein und zur höheren Überlebensrate der P-WSC1 und P-WSC2-Stämme. Eine Spezifität der Erkennung von Koffein der CWI-Sensoren konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Zellwandstress durch Caspofungin

Laut Literatur soll bei dem Zellwandstress Caspofungin eine Spezifität der Sensoren feststellbar sein. Publiziert ist, dass hauptsächlich Wsc1 an der Erkennung dieses Stresses beteiligt ist (Sanz *et al.*, 2017; Reinoso-Martín *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte nun jedoch für den $\Sigma 1278b$ -Stammbhintergrund festgestellt werden, dass bei Caspofunginstress Wsc1 nicht essentiell für die Zellen zu sein scheint und so konnte Wsc1 alleine keine Resistenz gegen diesen Zellwandstress vermitteln. Erst durch Überexpression konnte eine Resistenz erreicht werden, das gilt jedoch auch für die anderen Sensoren (Abbildung 35). Die Anwesenheit der Sensoren Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 konnten zudem Zellen ohne Wsc1, die Caspofungin ausgesetzt waren, eine gewisse Überlebenschance vermitteln, während ein Stamm, welcher nur Wsc1 enthielt, kaum überlebende Zellen aufweisen konnte. Auch eine Überexpression von Wsc1 verschaffte den Mutanten nur eine geringere Überlebensrate, als mit einem anderen, oder sogar keinem Sensor. Es scheint, als würde die alleinige Anwesenheit einer normalen Menge Wsc1 das Wachstum der Zellen bei Caspofunginstress hemmen. Eventuell spricht dies erneut für eine Regulation der Sensoren untereinander. Auffällig ist, dass die Menge an aktiviertem Slr2 in den Stämmen mit einem oder keinem Wsc- oder Mid-Sensor bei Caspofungin-Einfluss stark verringert war. Dies könnte die Wachstumseinschränkungen der Mutante erklären, jedoch zeigten die Mutanten mit überexprimierten Sensoren ebenfalls eine stark verringerte Menge an phosphoryliertem Slr2 (Abbildung 35). Wahrscheinlicher ist, dass das Wachstumsdefizit der Mutanten mit dem leicht verringertem Glucangehalt zusammenhängen könnten. Wie bekannt ist, hemmt Caspofungin die Glucansynthese (Deresinski & Stevens, 2003). Möglicherweise erreichen nur die Stämme mit vermehrter Sensorproduktion einen Schwellenwert der Glucanmenge, der es den Zellen ermöglicht, den durch Caspofungin induzierten Glucanverlust auszugleichen. Dabei ist jedoch die gemessene Menge an Glucan nicht verhältnismäßig zur Überlebensrate der Zellen bei Caspofungin. Ein Stamm mit nur Wsc1 zeigte eine höhere Menge an Glucan, als z.B. ein Stamm ohne Sensoren, während die Überlebensrate ein umgekehrtes Bild zeigt.

Wahrscheinlich kann trotz verringertem Glucangehalt die Zellwandstabilität in einem gewissen Maße erhalten bleiben, da die Menge an Chitin, auch in allen untersuchten Mutantenstämmen, bei Caspofunginstress erhöht wurde.

Zellwandstress durch Kongorot

Die Erkennung von Kongorot als Zellwandstress soll im CWI hauptsächlich durch den Sensor Mid2 erfolgen (Levin, 2011). Jedoch konnte in dieser Arbeit bereits erkannt werden, dass im $\Sigma 1278b$ -Stammbhintergrund Wsc1 für die Kongorotresistenz der Zellen benötigt wird und auch in der Literatur finden sich Hinweise, dass Wsc1 bei Kongorotstress eine essentielle Rolle spielt (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Dies konnte auch durch Untersuchungen der Einzelsensormutanten bestätigt werden. Nur Mutanten mit Wsc1 konnten eine Wachstumseinschränkung der Zellen bei Stress durch

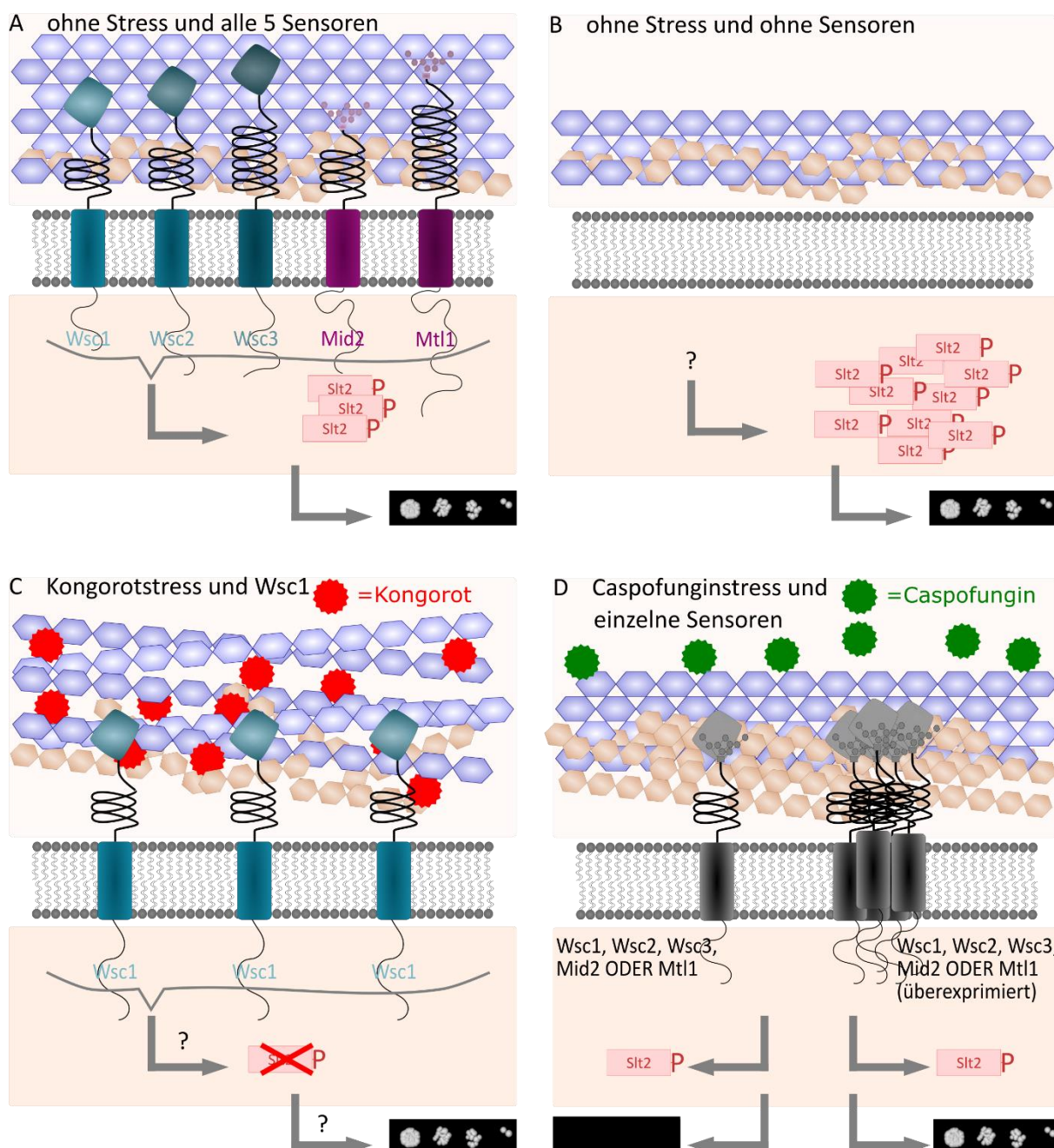


Abbildung 35: Zusammenfassung der Wachstumsphänotypen. A: Situation bei Normalbedingung und wenn alle Sensoren vorhanden sind. Bei Anwesenheit aller Sensoren und keiner Stresseinwirkung entspricht die Zellwandzusammensetzung dem Standard. Es ist eine basale Slt2-Phosphorylierung vorhanden und die Hefezellen sind keiner Wachstumseinschränkung ausgesetzt. B: Situation bei Normalbedingung und in Abwesenheit aller Sensoren. Sind alle Sensoren abwesend und es herrscht kein Stress, ist eine Reduktion der Glucanmenge feststellbar. Zudem ist eine gesteigerte Menge von phosphoryliertem Slt2 in den Zellen vorhanden und die Hefezellen unterliegen keiner Wachstumseinschränkung. C: Verarbeitung von Kongorotstress. Kongorot wird in den Zellen spezifisch durch den Sensor Wsc1 detektiert. Die Weiterverarbeitung des Signals wird nicht durch eine Slt2-Phosphorylierung erreicht. Es ist unbekannt, wie das Signal in der Zelle weitergegeben wird. Zellen, in denen Wsc1 vorhanden ist, können bei Kongorotstress wachsen. D: Verarbeitung von Caspofunginstress. Bei Caspofungineinfluss wird die Glucanmenge in der Zelle reduziert, während die Chitinmenge erhöht wird. Keiner der Sensoren kann alleine den Stress detektieren oder verarbeiten, die Slt2-Phosphorylierung ist im Vergleich zu einem Kontrollstamm stark reduziert. Es ist in diesen Stämmen kein Wachstum bei Caspofunginstress möglich. Sind die Sensoren jeweils überexprimiert, so können sie alle auch alleine Resistenz gegen Caspofungin vermitteln. Die Slt2-Phosphorylierung ist allerdings ebenfalls reduziert. Trotzdem kommt es einem Wachstum der Zellen bei Caspofungin.

das Zellwandgift vermeiden (Abbildung 35). Alle weiteren Wsc- oder Mid-Sensoren konnten, auch bei einer Überexpression, keine Resistenz gegen Kongorot vermitteln. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass Mid2 der Hauptsensor für diese Art Zellwandstress im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund ist. Eher ist neben Wsc1 der Sensor Wsc2 an der Signalweiterleitung bei Kongorotstress beteiligt. Wsc2 schien den Zellen einen Überlebensvorteil unter Stress durch Kongorot zu vermitteln, wenn auch keine wirkliche Resistenz. Zellen, die nur den überexprimierten Sensor Wsc2 trugen, zeigten bei Einfluss des Zellwandstress sogar eine höhere Überlebensrate, als ein Wildtypstamm. Somit zeigte Wsc2 erneut, dass es, wie in der Literatur beschrieben, zur Fitness der Zellen beitragen kann (Wilk *et al.*, 2010). Dieses Phänomen ist ebenfalls bei Zellen, die nur Wsc1 als CWI-Sensor zur Verfügung hatten, zu beobachten. Die Wichtigkeit des Wsc1-Sensors bei Kongorot wird zudem durch die sehr starke Aktivierung der Kinase Slt2 in Stämmen, die kein Wsc1-Protein besaßen, ausgedrückt. Für den $\Sigma 1278b$ -Stamm konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Kinase nicht essentiell für die Zellen bei Kongorotstress ist (Abbildung 35). Die starke Steigerung der Menge an phosphoryliertem Slt2 in *wsc1 Δ* -Mutanten, könnte auf eine allgemeine Stressreaktion auf die Abwesenheit von Wsc1 und der gleichzeitigen Anwesenheit eines starken Zellwandgiftes, wie Kongorot, sein. Dies würde auch die Erhöhung der Menge an aktiviertem Slt2 bei den Einzelsensormutanten ohne Wsc1 erklären, während die Mutante mit nur Wsc1 einen starken Rückgang der phosphorylierten Menge an Slt2 zeigte. Der getestete Wildtypstamm zeigte ebenfalls eine höhere Aktivierung von Slt2 bei Kongorotstress an, als die WSC1-Mutante. Dies könnte erneut auf gegenseitige Regulationsmechanismen der Sensoren hinweisen, die im Wildtyp-Zustand die Aktivierung des CWI steigern. Die Steigerung der CWI-Aktivierung könnte zusätzlich helfen, eine starke Reaktion auf diesen Stress und somit eine verstärkte Zellwandintegrität möglich zu machen. Die verstärkte Reaktion der Einzelsensormutanten im Vergleich zur Kontrolle und zu einem Stamm gänzlich ohne Sensoren, könnte zudem auf eine gegenseitige drosselnde Wirkung der Sensoren hinweisen, die möglicherweise eine bessere Regulierbarkeit der Stressantwort gestatten. In einem weiteren Schritt sollte die Zellwandzusammensetzung in den untersuchten Stämmen im S288C- und im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund unter Kongorotstress analysiert werden. Dies könnte eventuell zur Klärung der Unterschiede in der Kongorotstress-Verarbeitung beider Stammhintergründe beitragen.

3.2 Oberflächenwahrnehmung der Wsc- und Mid-Sensoren

Die Funktion der Wsc- und Mid-Proteine als Mechanosensoren wird bis heute zwar angenommen, ein direkter Nachweis dafür wurde allerdings noch nicht erbracht. Für Wsc1 wurde gezeigt, dass der Serin-/Threonin-reiche Bereich des Sensors die Eigenschaft einer Nano- oder „Hookeschen“ Feder besitzt (Dupres *et al.*, 2009). Zudem werden Proteine aus anderen Organismen, wie z.B. das Protein Polyzystin1 aus *Homo sapiens*, welches ebenfalls eine CRD trägt, zu den Mechanosensoren gezählt

(Qian *et al.*, 2005). Mechanosensoren sollen unter anderem auch an der Wahrnehmung von Kontakt zu verschiedenen Oberflächen beteiligt sein (Kumamoto, 2008). Durch Überprüfen des Wachstumsverhaltens der CWI-Sensoren auf verschiedenen Oberflächen, bzw. Medien, wurden nun in dieser Arbeit indirekt weitere Hinweise für eine potentielle Mechanosensitivität der Sensoren gesammelt.

Werden diploide Hefezellen einem Stickstoffmangel auf festem Medium ausgesetzt, so starten sie ein Differenzierungsprogramm, das zu einer kettenförmigen Wachstumsform mit verlängerten Zellen, dem Pseudohyphenwachstum, führt (Gimeno *et al.*, 1992). Dem Sensor Wsc1 wird eine Rolle während des pseudohyphalen, invasiven Wachstums zugeschrieben (Shively *et al.*, 2013). Allerdings konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, dass die Ab- oder Anwesenheit von Wsc1 oder eines anderen Sensors einen Einfluss auf die Bildung der Pseudohyphen in den Einzelsensormutanten hatte. Sie schien lediglich allgemein ein wenig verringert zu sein, im Vergleich zur Kontrolle, in der alle Sensoren vorhanden waren. Das könnte auf eine eventuell geringere Wachstumsrate der Mutanten zurückzuführen sein, was aber z.B. durch Durchführung von Wachstumskurven überprüft werden müsste. Im Gegensatz zu einem Stamm, dem das Flokkulin Flo11 fehlte, bildeten alle Stämme deutliche Pseudohyphen. Flo11 ist ein Protein, das essentiell für Oberflächen- und Nährstoff-abhängige Wachstumsformen der Hefe, wie Pseudohyphenwachstum, Adhäsion oder Biofilmbildung, ist (Lo & Dranginis, 1998; Reynolds & Fink). Einen Einfluss der Sensoren auf die Anwesenheit des Flokkulins konnte ausgeschlossen werden. Damit war es ebenfalls nicht überraschend, dass die CWI-Sensoren nicht an der Adhäsion an festen Agar-Medium bei einsetzendem Nährstoffmangel beteiligt waren.

Eine weitere Flo11-abhängige Wachstumsform bilden Hefezellen aus, wenn sie auf halbfesten Oberflächen wachsen. Sie formen dabei kreisförmige Biofilme, die sich durch ein Zentrum auszeichnen, das stark strukturiert ist und von dem aus sich die Strukturen speichenartig nach außen verbreiten. Diese Wachstumsform ist neben der Anwesenheit von Flo11, sowohl abhängig von der angebotenen Kohlenstoffquelle, als auch vom pH-Wert der Umgebung (Reynolds & Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2008). Der CWI-Sensor Wsc1 soll die Biofilmbildung auf halbfesten Medium Flo11-unabhängig beeinflussen. Eine Mutante ohne Wsc1 zeigte eine stark verringerte Ausbildung der strukturierten Biofilme, während die Flo11-Menge in den Zellen nicht beeinträchtigt war (Sarode *et al.*, 2014). Es wurde zudem gezeigt, dass die weitere CWI-Signalkaskade wahrscheinlich nicht an dieser Biofilmbildung beteiligt war, da Mutanten, in denen eine Interaktion von Wsc1 mit Rom2 unterbunden wurde, eine normale Biofilmbildung aufwiesen (Sarode *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst bestätigt werden, dass Wsc1, im Gegensatz zu allen weiteren CWI-Sensoren, einen Einfluss auf die Biofilmbildung auf halbfestem Medium hatte. Eine *WSC1*-Einzeldelentionsmutante zeigte einen deutlich verringerten Biofilm im Vergleich zur Kontrolle und Einzeldelentionsmutanten der anderen Sensoren. Jedoch wurde bei einer Analyse der Biofilmbildung der Einzelsensormutanten deutlich, dass die

alleinige Anwesenheit von Wsc1 nicht ausreicht, um eine Biofilmbildung der Hefezellen auszulösen. Selbst eine Überexpression dieses Sensors, aber auch aller anderen Sensoren, konnte eine Biofilmbildung auf halbfestem Medium nicht induzieren. Ebenso war es nicht möglich Biofilmbildung nach längerer Zeit bei den Einzelsensormutanten zu beobachten. Auch nach 14 Tagen war keine mit der Kontrolle vergleichbare Biofilmstruktur und -ausbreitung zu beobachten. Reduzierte man den Glukosegehalt des Mediums auf 0,5 %, stellte man fest, dass die Biofilme unregelmäßiger und kleiner als bei 2% Glucose waren. Die Zellen, in denen nur Wsc1 vorhanden war, zeigten dabei bei 0,5 % Glukose eine leicht vergrößerte Ausbreitung im Vergleich zu den Biofilmen der anderen Mutanten, die trotz allem geringer war, als bei 2 % Glukose. Der geringere Glukosegehalt ermöglicht zunächst eine schneller einsetzende Biofilmbildung, was vermutlich auf die gesteigerte Expression von Flo11 bei Glukosemangel zurückzuführen ist (Reynolds & Fink, 2001). Es ist möglich, dass die Ausbreitung der Biofilme auf 0,5 % Glukose reduziert ist, weil den Zellen das Nährstoffangebot zu gering ist und die Biofilmbildung ohne einen funktionierenden Metabolismus der Zellen eingestellt wird (Reynolds & Fink, 2001). Verringerte man die Glukosemenge auf 0,5 % Glukose, zeigte eine *wsc1Δ*-Mutante einen deutlich strukturierten Biofilm. Dieser ist unregelmäßiger geformt und weniger ausgebreitet, als der Film der Kontrolle, aber deutlich strukturierter als der Biofilm der Mutante mit nur Wsc1 oder ohne Sensoren. Es scheint also, als ob Wsc1 einen Nährstoff-abhängigen Einfluss auf die Biofilmbildung hat und zudem besteht die Möglichkeit, dass die anderen Sensoren über eine mögliche Zusammenarbeit oder gegenseitige Regulation einen Einfluss auf die Biofilmbildung nehmen. Eventuell ist die Biofilmbildung in den Einzelsensormutanten auch aufgrund einer möglichen Zellwandschwächung der Zellen reduziert, da in dieser Arbeit schon Hinweise auf einen durch die Abwesenheit von Wsc1 verursachten Zellwandstress gefunden wurden. Allerdings sollten dann die WSC1- und P-WSC1-Mutanten einen Biofilm ausbilden können. Sollte die Biofilmbildung nur durch eine Zusammenarbeit von verschiedenen CWI-Sensoren in den Zellen möglich sein, könnte dies durch weitere Untersuchungen mit Mutanten festgestellt werden, in denen unterschiedliche Kombinationen an Sensoren aktiv sind, indem man untersucht, wie die Biofilmbildung in diesen Stämmen vorhanden oder ausgeprägt ist.

Neben Nährstoffgehalt und pH-Wert, ist für die Biofilmbildung zudem die Bildung einer Art extrazellulären Matrix nötig, die den Biofilm umgibt. Diese Matrix besteht zu großen Teilen aus Mucin-ähnlichen Proteinen, wie z.B. Msb2 und Flo11, wobei Flo11 den größten Anteil an den Matrix-bildenden Proteinen stellt. Diese werden von der Zelle abgelöst und an die Umgebung abgegeben (Karunanithi *et al.*, 2010). Betrachtete man die Biofilmränder der Einzeldelensionsmutanten nach 14 Tagen, erkannte man um die Biofilme diese extrazelluläre Matrix. Diese war bei einem Wildtyp erwartungsgemäß deutlich ausgeprägt, während bei einer *flo11Δ*-Mutante kaum eine äußere Schicht zu erkennen war. Färbte man diese Matrix mit Ponceau S-Lösung an, war allerdings die Menge an

abgelösten Proteinen bei dem wildtypischen Biofilm nur leicht erhöht im Vergleich zur *flo11Δ*-Mutante. Es ist möglich, dass in dem getesteten Stamm die Matrix nicht hauptsächlich aus Flo11-Proteinen bestand. Zudem ist denkbar, dass die Ablösung des Flokkulins erst mit längerer Inkubationszeit der Biofilme eintritt, da in dieser Arbeit die Inkubationsdauer vier Tage und nicht wie in der Literatur sieben Tage betrug (Karunanithi *et al.*, 2010). Dafür könnte sprechen, dass allgemein die beobachtete abgelöste Schicht zum gleichen Zeitpunkt bei Wachstum auf Medium mit 0,5 % Glukose deutlicher zu erkennen war, als bei 2 % Glukose. Bei Hefemutanten, bei denen nur noch der Sensor Wsc2, Wsc3, Mid2, Mtl1, oder kein Sensor vorhanden war, zeigte sich eine ausgeprägte extrazelluläre Matrix und sehr unregelmäßige Ränder der Biofilme. Bei einer Mutante, die nur *WSC1* exprimierte, konnte beobachtet werden, dass die um den Biofilm liegende Schicht dünner und die Ränder des Biofilms glatter zu sein schien. Bei der Anfärbung der abgegebenen Proteine mit Ponceau S, konnte festgestellt werden, dass in den untersuchten Mutanten mehr Proteine abgelöst wurden, als bei einem Stamm mit allen Sensoren oder einer *flo11Δ*-Mutante. Bei allen Stämmen war die Menge an angefärbtem Protein bei 0,5 % Glukose höher, als bei 2 % Glukose. Am wenigsten Protein wurde bei einer Mutante, die nur noch Mid2 als CWI-Sensor trug, abgelöst. Die Mutante, die nur noch Wsc1 zur Verfügung hatte, zeigte am meisten abgelöstes, angefärbtes Protein. Somit schien bei dieser Mutante die Matrix dichter zu sein, als bei den anderen, da sie zwar laut Färbung mehr Protein enthielt, jedoch eine dünnere Schicht um den Biofilm bildete. Die Zusammensetzung der jeweiligen extrazellulären Matrix könnte durch Verwendung bestimmter Antikörper gegen spezifische Mucin-ähnliche-Proteine, wie z.B. Flo11, Msb2 oder andere Glykoproteine herausgefunden werden. Eine umfangreichere und genauere Angabe zur Zusammensetzung könnte zudem durch massenspektroskopische Untersuchungen der Proteine, die an eine Nitrocellulose-Membran haften, erhalten werden. Sollte es sich bei der großen Menge an abgelösten Proteinen hauptsächlich um Flo11 handeln, würde das bisher publizierten Daten widersprechen. Bei einer Analyse der Auswirkung von abgelöstem Flo11 auf die Biofilmbildung wurde festgestellt, dass eine große Menge des Proteins in der Matrix zu einer verstärkten Ausbreitung des Biofilms beiträgt (Karunanithi *et al.*, 2010). Die in dieser Arbeit untersuchten Biofilme der Mutanten zeigten jedoch eine geringere Ausbreitung im Vergleich zum Wildtyp.

3.3 S288C- und Σ 1278b-Stammhintergründe zeigen unterschiedliche CWI-Phänotypen

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Wsc-Sensoren und des Zellwandintegritäts-Signalweges (CWI) durchgeführt. Diese wurden in unterschiedlichsten Stammhintergründen der Hefe *S. cerevisiae* getätigt. In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass bei einem

Vergleich von *wsc1Δ*- oder *slt2Δ*-Mutanten der beiden Hintergründe S288C und Σ 1278b deutliche Unterschiede zu erkennen waren.

Setzte man *wsc1Δ*-Mutanten beider Stammhintergründe verschiedenen Zellwandstressen aus, war deutlich zu erkennen, dass die Σ 1278b-Mutante resistenter gegen Koffein zu sein schien. Andere getestete Stammhintergründe, wie der hier getestete S288C-Stammhintergrund, zeigten eine eher gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Koffein (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010; Jacoby *et al.*, 1998; Lussier *et al.*, 1997). Auch beim Glucansynthase-Hemmer Caspofungin war die Beobachtung zu machen, dass die *wsc1Δ*-Mutante im Σ 1278b-Hintergrund keine Wachstumseinschränkung im Gegensatz zum S288C-Stamm, zeigte. Die Zellen im Σ 1278b-Stammhintergrund schienen generell eine höhere Resistenz gegenüber manchen Zellwandstressen zu zeigen. Betrachtet man die Kontrollstämme beider Hintergründe bei Caspofungin-Stress, wuchsen die Zellen des S288C-Hintergrundes schlechter, als die des Σ 1278b-Hintergrundes. Ein ähnlicher Wachstumsunterschied der wildtypischen Zellen bei Koffeinstress ist dagegen nicht eindeutig zu erkennen. Dies müsste darüber hinaus quantifizierbar analysiert werden. Die erhöhte Resistenz des *wsc1Δ*-Stammes von Σ 1278b bei Caspofunginstress kann nicht durch eine erhöhte Menge an Glucan im Vergleich zum Kontrollstamm erklärt werden. Sowohl im S288C-, als auch im Σ 1278b-Stammhintergrund, sinkt die Menge an Glucan in der *wsc1Δ*-Mutante auf ca. 70 %. Unter Caspofunginstress zeigt außerdem der S288C-Stamm eine geringere Reduktion des Glucans, als die Mutante im Σ 1278b-Hintergrund. Somit scheint die verlorene Resistenz der *wsc1Δ*-Mutante im S288C-Hintergrund nicht ausschließlich auf einer Verringerung der Glucanmenge zu beruhen. Noch dazu ist die Aktivierung des CWI, welche durch die Phosphorylierung der Kinase Slt2 gezeigt wurde, in beiden Stammhintergründen unter Caspofungin-Einfluss in den *wsc1Δ*-Mutanten vergleichbar. Somit kann auch hier ein Einfluss auf die Resistenz der Mutanten ausgeschlossen werden.

Bei durch Kongorot verursachtem Stress zeigte sich, dass Wsc1 in beiden Hintergründen für eine Resistenz der Zellen gegen das Gift benötigt wurde. Auch für einen weiteren Stammhintergrund ist eine Empfindlichkeit gegenüber Kongorot einer *wsc1Δ*-Mutante beschrieben (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Diese Daten widersprechen der Annahme, dass Wsc1 bevorzugt für die Stressweiterleitung zuständig ist, wenn Zellen Caspofunginstress ausgesetzt wurden. Dagegen soll Kongorotstress bevorzugt von Mid2 erkannt werden (Sanz *et al.*, 2017). Vielmehr scheint zumindest in den untersuchten Stammhintergründen insbesondere Wsc1 sehr wichtig für die Erkennung von Kongorotstress zu sein.

Slt2 war in beiden Stammhintergründen bei Caspofungin- und Koffeinstress essentiell, bei Kongorot hingegen benötigte der Σ 1278b-Stamm diese Kinase scheinbar nicht für die Signalweiterleitung. Zu vermuten wäre, dass das Slt2-Paralog, die Pseudokinase Kdx1, diese Aufgabe in Σ 1278b übernehmen könnte, jedoch zeigte auch hier eine Deletionsmutante Wachstum auf Medium mit Kongorot, d.h. Kdx1

wird von der $\Sigma 1278b$ -Hefe ebenfalls nicht für die Signalweiterleitung bei Kongorotstress verwendet. Es müsste experimentell geklärt werden, ob in diesem Stammhintergrund eine andere CWI-Komponente oder eine in diesem Zusammenhang noch unbekannte Kinase die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren übernimmt. Denkbar wäre zudem, dass ein anderer Signalweg an dieser Stresserkennung beteiligt ist.

Trotz des nicht möglichen Wachstums der *wsc1Δ*-Mutanten beider Hintergründe bei Kongorotstress, zeigten beide eine eindeutige Slr2-Phosphorylierung. Die Aktivierung zeigte jedoch im $\Sigma 1278b$ - *wsc1Δ*-Stamm ein anderes Muster, als im S288C-Stamm. Der Wildtyp scheint im Verhältnis zur Bedingung ohne Stress weniger stark aktiviert zu sein, während die Menge an phosphoryliertem Slr2 in der $\Sigma 1278b$ -*wsc1Δ*-Mutante stark anstieg. Es bleibt zu klären, weshalb die Menge an aktiviertem Slr2, auch bei kürzer gemessenen Zeiträumen, dermaßen stark ansteigt, wenn es der Zelle keinen Wachstumsvorteil bringt. Denkbar wäre, dass es sich um eine verstärkte generelle Zellwandstress-Antwort der Zelle handelt, da Wsc1 fehlt. Die weniger starke Reaktion der *wsc1Δ*-Mutante im $\Sigma 1278b$ -Hintergrund bei Caspofunginstress, könnte mit einer höheren Resistenz gegenüber diesem spezifischen Gift erklärt werden.

Dieses differenzierte Verhalten der Aktivierung des CWI in den verschiedenen Stammhintergründen ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Zellwandintegrität nicht auf die gleiche Art und Weise aufrechterhalten wird oder dass die Stammhintergründe unterschiedlich empfindlich gegenüber Zellwandstress sind. Dafür sprechen auch die Unterschiede der gemessenen Chitinmengen. Es ist bekannt, dass die Chitinmenge bei Zellwandstress, oder zumindest in Mutanten, die Zellwandstress auslösen, stark ansteigen kann (Levin, 2005). Dieses Verhalten wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, sowohl in $\Sigma 1278b$ -, als auch S288C-Zellen stieg der Chitingehalt bei Zugabe von Caspofungin stark an. Dies zeigte sich vor allem in Wildtyp-Stämmen, als auch in den *slr2Δ*-Mutanten. Bei den *wsc1Δ*-Mutanten zeigte sich, dass die Menge an Chitin im S288C-Stamm um ein ca. vierfaches weniger bei Zellwandstress ansteigt, als in der $\Sigma 1278b$ -Mutante. Dies könnte damit zusammenhängen, dass bereits im ungestressten Zustand die Chitinmenge in der S288C-*wsc1Δ*-Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm sehr stark ansteigt, was die Mutante im $\Sigma 1278b$ -Hintergrund nicht zeigt. Somit ist die Menge an Chitin vor Stresszugabe schon sehr hoch und ein weiterer Anstieg ist eventuell nicht möglich. Dieses Resultat zeigte zudem, dass eine Deletion von *WSC1* im S288C-Stamm bereits intern Zellwandstress auslöst, während die $\Sigma 1278b$ Mutante diese Reaktion nicht zu zeigen scheint. Eine Instabilität der Zellwand durch eine *WSC1*-Deletion wird für andere Stammhintergründe auch durch verschiedene Publikationen gestützt, die beschreiben, dass eine *wsc1Δ*-Mutante bei erhöhten Temperaturen nicht mehr wachsen kann. Dieser Phänotyp kann aber durch eine osmotische Stabilisierung durch Zugabe von Sorbitol supprimiert werden (Levin, 2011; Verna, J. et al., 1997).

Auch eine verstärkt wahrnehmbare Zellkernlokalisierung von Rlm1 in S288C- und Σ 1278b-*wsc1Δ*-Zellen unter Normalbedingungen kann für eine erhöhte Zellwandempfindlichkeit in diesen Mutanten sprechen. Eventuell wird die Expression von Zellwandproteinen oder Proteinen für die Biogenese der Wand verstärkt angeregt, um die Stabilität der Zelle aufrecht zu erhalten. Eine ähnliche Lokalisationsveränderung des SBF-Komplexes konnte nicht eindeutig erkannt werden, jedoch ist dieser auch eher an einer Zellzyklus-verbundenen Regulierung der Transkription beteiligt und somit ist die Zellwandstress-induzierte Aktivierung des SFB eventuell weniger einfach feststellbar (Breedon, 2003). Die deutlichen Unterschiede der Zellantwort des CWI bei verschiedenen Stressen innerhalb der Spezies *S. cerevisiae* sind überraschend, sie können jedoch die Vielzahl der teilweise widersprüchlichen Informationen bezüglich des CWI und seinen Proteinen in Hefe erklären. Bekannt war bisher, dass es bezüglich des konservierten CWI und den assoziierten Proteinen in verschiedenen Pilzspezies Unterschiede gibt (Tabelle 5). In *Kluyveromyces lactis* wurde weder *KlWsc1*, noch *KlMid2* für eine

Tabelle 5: Wachstumsverhalten von *wsc1Δ*-Mutanten der Spezies *S. cerevisiae*, *K. lactis* und *C. albicans*. Gezeigt sind die Phänotypen der Mutanten bei verschiedenen Stressen, vorhandene Resistenz ist mit Plus (+) gekennzeichnet, Empfindlichkeit gegenüber den Stressen mit Minus (-). Die Angaben, die nicht dieser Arbeit entstammen, wurden mit einem Stern markiert und folgenden Quellen entnommen: (Auesukaree *et al.*, 2009; Dichtl *et al.*, 2016; Rodicio *et al.*, 2008; Reinoso-Martín *et al.*, 2003)

<i>Sc/Kl/Cawsc1Δ</i>				
	Kongorot	Caspofungin	Koffein	37 °C
<i>S. cerevisiae</i>				
Σ 1278b	-	+	+	
S288C	-	-	-	_*
andere	_*	_*	_*	_*
<i>K. lactis</i>	+*		+*	+*
<i>C. albicans</i>	+*	_*		

Resistenz gegen Kongorotstress gebraucht. Erst eine Doppelmutante zeigte Wachstumseinschränkungen bei Stress (Rodicio *et al.*, 2008). Die Doppelmutante in *K. lactis* konnte im Gegensatz zu publizierten *S. cerevisiae*-Doppelmutanten ohne osmotischen Stabilisator überleben (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999; Rodicio *et al.*, 2008). Zudem konnten *KlWsc1* und *KlMid2* einen Wachstumsdefekt einer *Scwsc1Δ mid2Δ*-Doppelmutante nur bedingt komplementieren (Rodicio *et al.*, 2008). Auch bei pathogenen Pilzen spielt der CWI eine bedeutende Rolle, zum einen als Signalweg für Stressantworten bei Zellwandstressen und Fungiziden, zum anderen soll der CWI auch einen Einfluss auf die Pathogenität verschiedener Pilze haben. (Dichtl *et al.*, 2016). In z.B. *C. albicans* vermittelt das

Wsc1 Homolog *CaWsc1* Resistenz gegen Echinocandine, zu denen auch Caspofungin zählt, zeigt aber keine Funktion bei Zellwandstress, wie Kongorot oder Calcofluorweiß (Dichtl *et al.*, 2016). Interessanterweise scheint *C. albicans* zudem generell weniger resistent gegen Caspofungin zu sein, als *S. cerevisiae* (Reinoso-Martín *et al.*, 2003). Dies weist zwar auf eine generelle funktionelle Konservierung des CWI zwischen den Pilzen hin, zeigt jedoch auch, dass diese durchaus unterschiedlich auf bestimmte Stresse reagieren.

3.4 Exponierte aromatische Aminosäuren in der Wsc-Domäne sind essentiell für die Funktion des Wsc1-Sensors

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene aromatische Aminosäuren essentiell für die Funktion des Wsc1-Sensors sind. Diese Aminosäuren liegen in der CRD des Sensors, deren Struktur 2017 im Rahmen einer Masterarbeit gelöst werden konnte (Schöppner, 2017). Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass sowohl die komplette Wsc1 CRD, als auch einzelne hoch konservierte Cystein-Reste essentiell für die Funktionalität des Proteins sind (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010; Lodder *et al.*, 1999b). Außerdem soll eine Gruppierung der Sensoren, z.B. bei Einwirkung von verschiedenen Stressen, ebenfalls von der CRD abhängen. Zudem soll sich in Zellen, in denen sich mit GFP fusionierte Wsc1-Proteine mit mutierten CRDs befinden, die Lokalisation der Sensoren in die Vakuole verlagern (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010).

Diese Arbeit bestätigte die Fähigkeit des Wsc1-Sensors, Resistenz gegen bestimmte Zellwandstresse zu vermitteln, wie es in vielen vorherigen Arbeiten publiziert wurde (Levin, 2011; Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Deutlich war dabei zu erkennen, dass die CRD für diese Funktion des Sensors bei Zellwandstress benötigt wurde. Hier wurde gezeigt, dass der Austausch von exponierten Aromaten oder die Entfernung der CRD zu einer verlorenen Funktionalität des Wsc1-Proteins führen kann. So zeigten die untersuchten Mutanten teilweise Wachstumseinschränkungen bei Exposition mit den Zellwandstress Kongorot oder Caspofungin.

Die Aromaten wurden in verschiedenen Gruppen gegen Alanin ausgetauscht. Die Gruppierung der Aminosäuren erfolgte aufgrund ihrer räumlichen Nähe innerhalb der gelösten Kristallstruktur (Schöppner, 2017). Tauschte man Aminosäure-Gruppe 1 (Y22, Y24, Y107) oder -Gruppe 2 (Y64, Y70, Y104) aus, waren die Zellen nicht mehr dazu in der Lage, bei den getesteten Zellwandstress zu wachsen. Dies spricht dafür, dass diese Aromaten für die Funktion des Sensors benötigt werden oder dass die Struktur der CRD durch die Austausche instabil wurde. Gegen letzteres spricht allerdings, dass CRD-Mutanten, in denen Gruppe 3 (Y41, W43, Y89, F91, Y93) ausgetauscht wurde, in der Lage sind, Resistenz gegen Kongorot zu vermitteln, obwohl die Stabilität der CRD-Struktur durch fünf Austausche stärker geschwächt sein müsste. Für eine funktionelle Rolle der aromatischen Aminosäuren spricht

zudem, dass das einzeln ausgetauschte Tyrosin an Position 60 beim Wachstum unter Caspofungin-Stress ebenfalls einen Einfluss zu haben scheint.

Durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Sensoren mit mutierten CRDs konnte festgestellt werden, dass eine deutlich erhöhte Menge an Fusionsprotein im Zellinneren zu finden war. Ob es sich dabei um die Vakuole handelte, müsste durch eine Anfärbung oder durch Analyse von spezifischen Markerproteinen überprüft werden. Wie zuvor erwähnt, wurde eine verstärkte Verlagerung von Wsc1-Sensoren mit mutierten CRDs in die Vakuole bereits beobachtet (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Zum einen könnte dies auf eine Einleitung der Degradation der eventuell fehlerhaft gefalteten Proteine hinweisen. Zum anderen ist bekannt, dass die polarisierte Lokalisation und Funktion von Wsc1 von einer regulierten Endozytose durch ein NPFX_(1,2)D-Signal abhängt. Dabei wird vermutet, dass die Endozytose nicht zu einem Abbau in der Vakuole führt, sondern zu einem Recycling des Sensors vom Endosom zur Plasmamembran (Piao *et al.*, 2007). Sollte das Recycling von Endosom zu Membran gestört sein, würde es ebenfalls zu einer Ansammlung von Protein im Zellinneren kommen. Eine Anhäufung von Sensoren im Zellinneren und die Störung des Recyclings zurück zur Plasmamembran, könnte zu einer Verringerung der Sensormenge in der Zellwand führen, was wiederum eine Verringerung der Funktionsfähigkeit bei Zellwandstress mit sich bringen kann. Ob eine Reduzierung der Sensormenge in der Plasmamembran in den Stämmen mit mutiertem Wsc1 vorlag, wurde in dieser Arbeit nicht quantifiziert, jedoch wurde die Aktivierung des CWI durch einen Slt2-Phosphorylierungs-Assay analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Menge an aktiviertem Slt2 bei Zellwandstress in den CRD-Mutanten oder Mutanten ohne CRD verringert war. Eine ähnliche Verringerung der Slt2-Aktivierung wurde bei CRD-Mutanten festgestellt, bei denen die konservierten Cysteine zu Alanin mutiert waren und bei denen ebenfalls eine Verlagerung der Lokalisation von der Plasmamembran ins Zellinnere zu beobachten war (Kock *et al.*, 2016). Allerdings konnten die Wachstumsdefekte der Zellen mit den verschiedenen Wsc1-Varianten auf Zellwandstress, nicht mit der reduzierten Slt2-Phosphorylierung bei Kongorotstress korreliert werden, weshalb die verringerte CWI-Aktivierung nicht der Grund für fehlendes Wachstum sein kann. Zudem wurde eine Reduzierung des β -1,3-Glucangehaltes in Zellen mit mutiertem Wsc1 festgestellt, was auf eine verringerte Aktivierung des CWI schon in Zellen, die keinerlei Stress ausgesetzt wurden, hinweisen könnte.

Über die genaue Funktion der CRD für die Signalweiterleitung bei Stress ist noch nichts Genauereres bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass eine Gruppierung in Mikrodomänen des Sensors Wsc1 für die

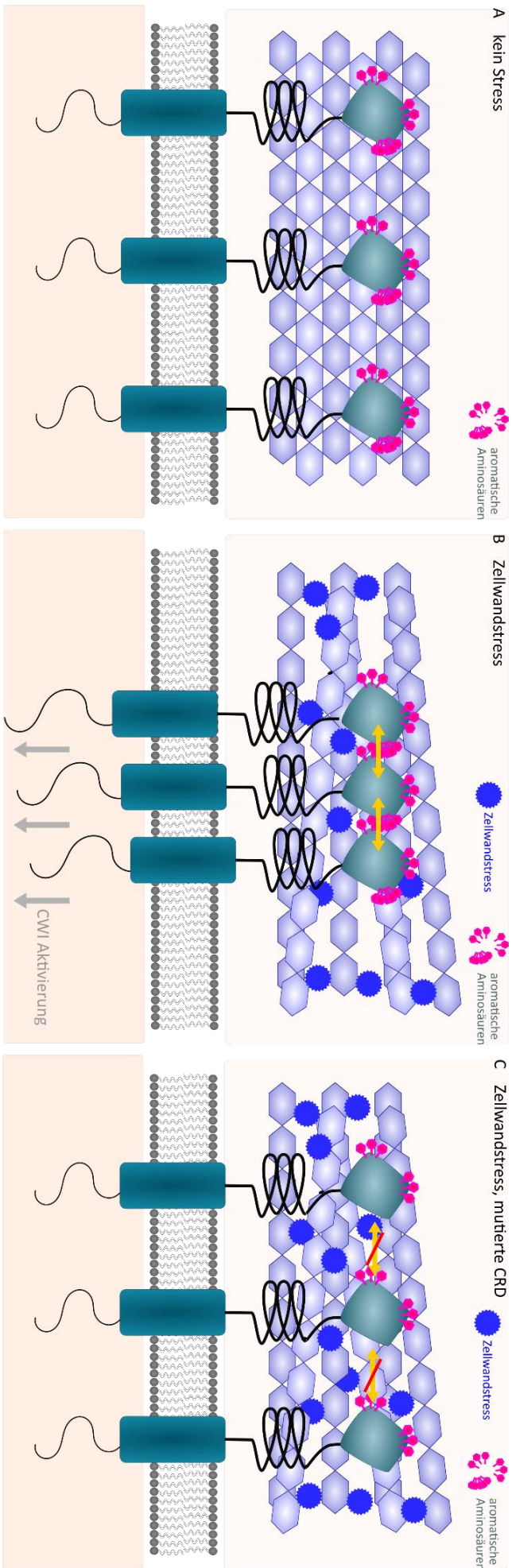


Abbildung 36 Modell der funktionellen Rolle der aromatischen Aminosäuren in der CRD. A: Ist kein Stress in den Zellen vorhanden, liegen die Sensoren einzeln in der Zellwand vor. Die aromatischen Aminosäuren dienen eventuell der Verknüpfung der CRD zu den Polysacchariden der Zellwand. B: Bei Zellwandstress sollen die Sensoren in Gruppierungen vorliegen. Es ist denkbar, dass dabei die Gruppen aus aromatischen Aminosäuren homotypische Interaktionen zwischen den Kopfgruppen möglich machen und somit die Gruppierung der einzelnen Sensoren. C: Fehlt eine oder mehrere der aromatischen Aminosäuregruppen, könnte die Gruppierung der Sensoren gestört sein und somit die Funktion der Sensoren bei Zellwandstress nicht gewährleistet sein.

Signalweiterleitung benötigt wird und dass diese Gruppierung von der CRD abhängt. Es wird dabei angenommen, dass die CRD Protein-Protein Interaktionen vermitteln könnte (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010).

Es ist publiziert, dass z.B. das Flokkulin Flo11 in der Lage ist, über aromatische Aminosäurebänder an der Oberfläche der Adhäsionsdomäne, homotypische Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Diese Interaktion soll dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäurebänder gewährleistet werden (Kraushaar *et al.*, 2015). Denkbar wäre, dass über die Ansammlungen von Aromaten an der Oberfläche der CRD von Wsc1 ebenfalls eine Interaktion zwischen einzelnen Sensoren möglich wäre, was zu der Bildung der Mikrodomänen führen könnte (Modell: Abbildung 36). Dafür wurden jedoch bisher keine hinreichenden Hinweise gefunden (Schöppner, 2017). Anhand der Fluoreszenzaufnahmen der Wsc1-Sensoren mit natürlicher oder mutierter CRD konnten in keinem Fall deutliche Mikrodomänen in der Zellwand erkannt werden. Dies könnte jedoch auch an der zu geringen Auflösung des verwendeten Mikroskops und den starken Signalen aus dem Zytoplasma liegen. Es wird ebenfalls vermutet, dass die CRD mit den Glucanen der Zellwand interagieren könnte. Diese Interaktion wäre ein deutliches Zeichen dafür, dass der Sensor Integrin-ähnlich eine mechanosensorische Funktion haben könnte. Eine Glucan-bindende Funktion der CRD wurde vermutet, da man CRDs z.B. in pilzlichen Exonukleasen findet, in denen sie die Bindung an Glucane vermitteln sollen (Heinisch, Dupres & Wilk *et al.*, 2010). Jedoch konnte in der 2017 erhaltenen Struktur der Wsc1 CRD keine Bindestelle für Glucane erkannt werden (Schöppner, 2017).

Es müssen weitere Untersuchungen mit wildtypischen und mutierten Proteinen durchgeführt werden, um eine potentielle Protein-Protein-Interaktion vermittelnde Rolle der CRD aufzuklären, wie z.B. Hefe-2-Hybrid-Experimente („Yeast-Two-Hybrid“, Y2H) oder bimolekulare Fluoreszenzkomplementation („bimolecular fluorescence complementation“, BiFC). Zudem sollten weitere Analysen durchgeführt werden, um festzustellen, ob die CRD an bestimmten Zellwandbestandteilen, oder anderen Zellwandproteinen haftet. Ebenso interessant wäre außerdem, die Strukturen der CRDs der anderen Wsc-Sensoren zu lösen. Damit könnte analysiert werden, ob auch in diesen CRDs aromatischen Aminosäuren gruppiert und exponiert sind und ob diese ebenfalls essentiell für die Proteinfunktionen sind.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich bei Hefen des verwendeten Σ 1278b-Stammhintergrunds von *S. cerevisiae* teilweise eine funktionale Spezifität der Wsc- und Mid-Sensoren feststellen lässt. Wsc1 zeigte auch in dieser Arbeit, dass er vermutlich einer der Hauptsensoren des CWI ist. Es wurde deutlich, dass Wsc1 Resistenz gegen Kongorot vermittelt und bei der Biofilmbildung beteiligt ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Wsc1 scheinbar im Σ 1278b-

Stamm weder an der Wahrnehmung von Caspofungin, noch an der Koffeinstress-Erkennung beteiligt ist. Zudem wurde festgestellt, dass Mutationen von aromatischen Aminosäuren in der CRD von Wsc1, die Sensorfunktion behindern können.

Der Sensor Wsc2 zeigte vor allem in der überexprimierten Form, dass er unter Stressbedingungen zum Überleben der Zellen beitragen kann, auch wenn er dabei keine spezifische Resistenz vermittelt. Für die weiteren Sensoren konnte zwar keine direkte Funktion gezeigt werden, allerdings kann die Vermutung angestellt werden, dass sie regulatorisch an der Sensorfunktion von Wsc1 beteiligt sein könnten. Unter diesem Aspekt sollte auch das Protein Wsc4 weiter betrachtet werden. Es wird nicht zu den CWI-Sensoren gezählt, da es im ER lokalisiert sein soll (Mamoun *et al.*, 1999). Jedoch wurde in einer im Rahmen dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit eine Zellwandlokalisierung von Wsc4 gezeigt (Daten nicht gezeigt) (Schmitt, 2017). Dies könnte auf eine CWI-verbundene Funktion von Wsc4 hinweisen, allerdings konnte in dieser Arbeit keine spezifische Funktion für Wsc4 in Stämmen, die nur noch dieses Protein tragen (Stämme, die als -5 bezeichnet werden), festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit bot einige neue Erkenntnisse, die Fragen bezüglich des Zellwandintegritätsweges, seiner Stresserkennung und -verarbeitung aufwerfen. Einige bisherige Theorien gehen bei Zellwandstress von einer linearen, positiv beeinflussenden Signalkette von Stresserkennung bis Zellviabilität aus. Der Stress wird von den Sensoren der Wsc- und Mid-Familie erkannt, welche den CWI aktivieren und final die Zellviabilität durch eine Erhöhung der Zellwandstabilität gewährleisten. Allerdings konnte diese Arbeit zeigen, dass nicht immer eine Korrelation zwischen den einzelnen Punkten der Stressverarbeitung vorhanden war. So konnte teilweise eine Slt2-Phosphorylierung bei Stress festgestellt werden, obwohl keine Wsc- oder Mid-Sensoren vorhanden waren, die den CWI aktivieren können. Hier bleibt zu klären, über welche anderen Wege diese Aktivierung von Slt2 zustande kommt. Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht immer eine Slt2-Phosphorylierung benötigt wird, um Zellwachstum und Zellviabilität bei Zellwandstress zu ermöglichen und zu erhalten. Im Gegensatz dazu konnte zudem gezeigt werden, dass teilweise trotz vorhandener Slt2-Aktivierung kein Wachstum der Zellen bei Stress vorhanden war und die Zellviabilität nicht positiv beeinflusst wurde. Auch hier bleibt zu klären, wie genau der Zusammenhang von Slt2-Phosphorylierung und Zellviabilität bei Zellwandstress ist. Zusätzlich konnte nicht immer eine Korrelation des Zellwachstums mit der Zellwandzusammensetzung erkannt werden. Dies lässt die Frage offen, wie Zellen mit verringertem Glucangehalt teilweise wachsen können, während andere Stämme dies nicht können. Somit muss es bei Zellwandstress verschiedene Systeme geben, die Slt2 ohne Wsc1- oder Mid-Sensoren aktivieren, die Zellviabilität ohne Beteiligung des CWI bei Zellwandstress aufrechterhalten und die auch bei Verringerung des Glucangehalts ein Zellwachstum ermöglichen. Die Identifizierung dieser Systeme muss Zukunft durch weitere Experimente erfolgen.

Der CWI ist mit seinen Sensoren eine in Pilzen hoch konservierte Signaltransduktionskaskade (Dichtl *et al.*, 2016). Ebenso ist die pilzliche Zellwand in ihrem Aufbau aus Chitin, Glucanen und Mannoproteinen konserviert. Die Konservierung macht die Proteine des CWI und die pilzspezifische Zellwand als Ziel für die Entwicklung von Medikamenten gegen pathogene Pilze interessant. Da Pathogene immer mehr Resistenzen gegen häufig verwendete Behandlungsmittel entwickeln, ist es wichtig, stets neue Therapeutika zu finden. Eine große Herausforderung könnten dabei die potentiellen Unterschiede der Empfindlichkeit der Zellwand und der Aktivierung des CWI zwischen verschiedenen Arten oder Stämmen, die auch in dieser Arbeit erkannt wurden, darstellen. Pathogene Spezies nutzen bei einer Infektion die Bildung von Biofilmen, um sich gegen Medikamente oder ähnliches zu schützen (Reynolds & Fink, 2001). So eröffnet auch die Beteiligung des CWI-Sensors Wsc1 an der Biofilmbildung neue Möglichkeiten, pathogene Pilze zu schwächen, indem durch eine weitere Erforschung der Funktionsweise der CWI-Sensoren neue Therapiemöglichkeiten gegen pathogene Pilze entwickelt werden.

4 Material

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von CARL ROTH GMBH + CO. KG, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH bzw. MERCK KGAA, VWR INTERNATIONAL GMBH, ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., GREINER BIO ONE INTERNATIONAL GMBH und SARSTEDT AG & CO. KG.

Tabelle 6: Verwendete Enzyme, Kits und Sonstiges

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alle verwendeten Restriktionsenzyme	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.
Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Blotting Membran	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
„Blotting“-Papier	VWR INTERNATIONAL GMBH
Dpnl	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GMBH & CO. KG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.
Phusion Polymerase	Selbst hergestellt
Taq DNA Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH

4.2 Auftragsarbeiten

Sequenzierungen wurden von MICROSYNTH AG durchgeführt. Synthetische Oligonukleotide wurden ebenfalls von MICROSYNTH AG hergestellt.

4.3 Verwendete Geräte und Programme

Tabelle 7: Relevante Geräte

Gerät	Hersteller
Beleuchtungseinrichtung „RB5000“	KAISER FOTOTECHNIK GMBH & CO.KG
Brutschrank „B5042“	HERAEUS HOLDING GMBH
CCD-Kamera „ORCA-ER-1394“	HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GMBH
Chemolumineszenz-Detektions-Gerät „Chemostar Professional Apparatur“	INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH
Digitalkamera „Canon PowerShot A620“	CANON DEUTSCHLAND GMBH
DNA-Geldokumentations-Anlage „GelDoc XR Systems“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Durchlichtmikroskop „Axioskop 40“	CARL ZEISS AG
Fluoreszenzmikroskop „AxioImager A1“	CARL ZEISS AG
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	CARL ZEISS AG
Fluorimeter „Synergy™ Mx“	BIOTEK INSTRUMENTS, INC.
Heizblock/Inkubator „ThermoMixer C“	EPPENDORF AG
Hybridisierungssofen „HYBRID Mini 38“	H. SAUR LABORBEDARF
Kühlzentrifuge „4K15“	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GMBH

Gerät	Hersteller
Magnetrührer „MR 3001“	HEIDOLPH INSTRUMENTS GMBH & CO.KG
Netzteil „PowerPac Basic™“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Netzteil „PowerPac™ HC“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
PCR-Maschine „Primus 25 advanced“	VWR INTERNATIONAL GMBH
PCR-Maschine „TProfessional Basic Gradient“	BIOMETRA GMBH
pH-Meter „Seven Easy“	METTLER-TOLEDO GMBH
Protein-Gelelektrophorese-Apparatur „Mini-PROTEAN®3 Cell“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Protein-Transfer-Apparatur „Mini Transfer Electrophoretic Transfer Cell“	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Rollinkubator „Stuart® SRT1“	BIBBY SCIENTIFIC LIMITED
Rollinkubator „Stuart® SRT6“	BIBBY SCIENTIFIC LIMITED
Rotationsinkubator	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Schüttelinkubator „Certomat® R“	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GMBH
Schüttelinkubator „KS-15“	EDMUND BÜHLER GMBH
Schüttelinkubator „SM-30“	EDMUND BÜHLER GMBH
Stereomikroskop „Stemi 2000-C“	CARL ZEISS AG
Tetradenmikroskop „MSM System© series 300“	SINGER INSTRUMENTS
Tischautoklav „LTA 2 × 3 × 4“	ZIRBUS TECHNOLOGY GMBH
Tischkühlzentrifuge „Biofuge fresco“	HERAEUS HOLDING GMBH
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	HERAEUS HOLDING GMBH
Vortexer „Vibrax VXR Basic“	IKA®-WERKE GMBH & CO. KG
Vortexer „Vortex Genie 2“	SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.
Zelldichte-Messgerät „Ultrospec™ 10“	GE HEALTHCARE EUROPE GMBH
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	HERAEUS HOLDING GMBH

Tabelle 8: Relevante, verwendete Programme

Programm	Bezugsquelle/Quelle
Clone Manager	SCIENTIFIC & EDUCATIONAL SOFTWARE
Gen5™	BIOTEK INSTRUMENTS, INC.
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/ ; (Schneider <i>et al.</i> , 2012)
Inkscape	https://inkscape.org/de/
Intas Chemostar	INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH
Jalview 2.10.5	http://www.jalview.org/ ; (Waterhouse <i>et al.</i> , 2009)
Microsoft „Excel“	MICROSOFT CORPORATION
Microsoft „Word“	MICROSOFT CORPORATION
PyMOL	THE PYMOL MOLECULAR GRAPHICS SYSTEM, VERSION 2.0 SCHRÖDINGER, LLC
Quantity One 1-D	BIO-RAD LABORATORIES GMBH
Sequencher 4.10.1 Demo	GENE CODES CORPORATION
SnapGene Viewer	GSL BIOTECH LLC
Volocity®5.0.3/5.2.1	PERKINELMER INC.

4.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden in TBST-Puffer + 3 % Milchkpulver oder 3 % BSA angesetzt.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper. Sekundärantikörper sind grau markiert.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-anti- Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204); polyklonal	1:1000	CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC, 9101
Maus-anti- Mpk1 (D-1); monoklonal	1:1000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc., sc-374434
Maus-anti- mNeongreen ; monoklonal	1:1000	CHROMOTEK GMBH, 32f6-100
Kaninchen-anti- Tubulin ; monoklonal	1:10 000	ABCAM PLC., ab184970
Kaninchen-anti- Flo11 ; polyklonal	1:2500	Eigene Herstellung
Ziege-anti- Kaninchen Peroxidase-gekoppelt	1:10 000	CAYMAN CHEMICAL, cay10004301-1
Ziege-anti- Maus Peroxidase-gekoppelt	1:3000	DIANOVA GMBH, 115-035-003
Ziege-anti- Kaninchen Dylight™ 488-gekoppelt	1:1000	DIANOVA GMBH, 111-485-003

4.5 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen in dH₂O angesetzt.

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
8 M Harnstoffpuffer (HU-Puffer)	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 1,5 % (w/v) DTT 0,1 mM EDTA 8 M Harnstoff 200 mM NaH ₂ PO ₄ 5 % (w/v) SDS	SDS-PAGE
Alkalischer Lysepuffer	7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 1,85 M NaOH	Proteinextraktion
ECL-Lösung	100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 2,5 mM Luminol 0,45 mM Paracumarsäure 5,4 mM H ₂ O ₂	Western Blot
Ladepuffer (blau; 6x)	10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0.03 % Bromphenolblau 0.03 % Xylencyanol 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA	DNA-Gelelektrophorese
LiPEG	1 mM EDTA 100 mM LiOAc 40 % (w/v) PEG 4000 10 mM Tris-HCl (pH 8)	Herstellung kompetenter Hefezellen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
LiORB	1 mM EDTA 100 mM LiOAc 1 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl (pH 8)	Transformation von Hefezellen
Lösung 1	10 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)	Plasmidisololation
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS	Plasmidisololation
Lösung 3	5 M KOAc 2 M Essigsäure	Plasmidisololation
Lysepuffer	100 mM LiOAc 1 % SDS	Gesamt-DNA-Isolation aus Hefe
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO	Bestimmung des Glucan-/Chitingehaltes, Immunfluoreszenz
Phusion-Puffer (10x)	200 mM Tris-HCl (pH 8,8) 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 40 mM MgSO ₄ 1 % (v/v) Triton X-100 1 mg/ml BSA	PCR
Ponceau S	1 % (w/v) Ponceau S 1 % (w/v) Essigsäure	Anfärbung von an Nitrocellulose kovalent gebundene Proteine
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 4H ₂ O 30 mM K-Acetat (pH7,5) 10 mM CaCl ₂ 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>
RF2-Lösung	10 mM RbCl 10 mM MOPS, pH 6,8 75 mM CaCl ₂ 2H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin pH 6,8 mit NaOH einstellen	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>
SDS-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS	SDS-PAGE
Stripping-Puffer	2 % SDS 100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 M β-Mercaptoethanol	Western Blot

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 20 mM NaOAc 2 mM EDTA pH 8,3 mit NaOH einstellen	DNA-Gelelektrophorese
TBS (10x)	1,4 M NaCl 200 mM Tris-Base pH 7,6 mit HCl einstellen	Western Blot
TBST	1 x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20	Western Blot
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol	Western Blot

4.6 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und zugehörigen Stammlösungen wurden in dH₂O angesetzt. Die Medien und Lösungen wurden zur Sterilisation autoklaviert oder sterilfiltriert. Für Festmedien wurde 2 % (w/v) hinzugefügt, für halbfeste Agarplatten 0,3 % Agar-Agar. Bei Bedarf wurden nach einer Abkühlungszeit gewünschte Antibiotika hinzugefügt.

Tabelle 11: Verwendete Nährmedien

Medien	Zusammensetzung
Aminosäure-Mix („Drop-out Mix“)	20 g aller Standardamino-säuren +/- Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin 2 g p-Aminobenzoat 5 g Adenin
GNA	5 % (w/v) Glukose 3 % (w/v) Difco „Nutrient Broth“ 1 % (w/v) Hefeextrakt
LB („Lysogeny Broth“)	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl
LFM („Low Fluorescence Medium“)	10 % (v/v) Salz-Stammlösung 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung 0,2 % (w/v) Aminosäure-Mix 2 % (w/v) Glukose
NGS	1 % (w/v) KOAc 0,05 % (w/v) Aminosäure-Mix
Salz-Stammlösung	5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,5 % (w/v) MgSO ₄ 0,1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) Ca ₂ Cl

Medien	Zusammensetzung	
SC-Medium („Synthetic Complete“)	0,15 % (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ ohne Aminosäuren und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,5 % (w/v)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,2 mM	myo-Inositol
	0,2 % (w/v)	Aminosäure-Mix
	2 % (w/v)	Glukose
SLAD („Synthetic Low Ammonia Dextrose“)	0,17 % (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ ohne Aminosäuren und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0,05 mM	Ammoniumsulfat
	2 % (w/v)	Glukose
Spurenelemente-Stammlösung	0,05 % (w/v)	H_3BO_4
	0,004 % (w/v)	CuSO_4
	0,01 % (w/v)	KI
	0,02 % (w/v)	FeCl_3
	0,04 % (w/v)	MnSO_4
Vitamin-Stammlösung	0,0002 % (w/v)	Biotin
	0,04 % (w/v)	Calcium Pantothenat
	0,2 % (w/v)	Inositol
	0,04 % (w/v)	Niacin
	0,02 % (w/v)	Para-amino Benzoat
	0,04 % (w/v)	Pyridoxin HCl
	0,04 % (w/v)	Thiamin HCl
YP („Yeast Extract, Peptone“)	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Trypton
YPD („Yeast Extract, Peptone, Dextrose“)	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (w/v)	Trypton
	2 % (w/v)	Glukose

4.7 Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden in sterilem dH_2O angesetzt und nach Abkühlen in gewünschter Konzentration in die Nährmedien gegeben.

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlsg-Konzentration	End-Konzentration	Herkunft
Ampicillin	100 mg/ml	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	CARL ROTH GMBH & CO. KG
Geneticin (G_{418})	200 mg/ml	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	CARL ROTH GMBH & CO. KG
Hygromycin B	300 mg/ml	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	DUCHEFA BIOCHEMIE
Nourseothricin (clonNAT)	200 mg/ml	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	WERNER BIO AGENTS

4.8 Stämme und Plasmide

4.8.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 13: Verwendete *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.

4.8.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 14 aufgeführt. Sie gehören, wenn nicht anders vermerkt, dem Hefestammhintergrund $\Sigma 1278b$ an.

Tabelle 14: Verwendete und hergestellte *S. cerevisiae*-Stämme

Stammsname	verwendete Bezeichnung	Ursprungs-stamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
ESM356-1	K		<i>MATa</i>	<i>S288C ura3-53 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	(Pereira <i>et al.</i> , 2001)	
YHUM0454 (MY1384)			<i>MATa</i>		Microbia, Inc.	
YHUM0476 (MY1406)			<i>MATa</i>	<i>ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	Microbia, Inc.	
YHUM0477 (MY1407)			<i>MATα</i>	<i>ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	Microbia, Inc.	
YHUM0462 (MY1392)	K		<i>MATa</i>	<i>trp1Δ0</i>	Microbia, Inc.	
YHUM0463 (MY1393)	K		<i>MATα</i>	<i>trp1Δ0</i>	Microbia, Inc.	
YHUM0464 (MY1394)	K		<i>MATa</i>	<i>ura3Δ0 leu2Δ0</i>	Microbia, Inc.	
YHUM2600/ YHUM2601	Wsc2-9Myc		<i>MATa</i>	<i>WSC2-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2602/ YHUM2603	Mid2-9Myc		<i>MATa</i>	<i>MID2-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2604/ YHUM2605	Wsc3-9Myc		<i>MATa</i>	<i>WSC3-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2607	Mtl1-9Myc		<i>MATa</i>	<i>MTL1-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2617/ YHUM2618	Mtl1-9Myc		<i>MATα</i>	<i>MTL1-9MYC::hphNT1 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2635/ YHUM2636	Wsc1-9Myc		<i>MATa</i>	<i>WSC1-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	
YHUM2658	Mtl1-9Myc		<i>MATα</i>	<i>MTL1-9MYC::kanMX4 ura3Δ0 leu2Δ0</i>	(Schmitz, 2016)	

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2747			<i>MATα</i>	S288C <i>his1Δ</i>	Stamm-sammlung AG Mösch	
YHUM2748			<i>MATα</i>	S288C <i>his1Δ</i>	Stamm-sammlung AG Mösch	
YHUM2530/ YHUM2531	<i>mid2Δ</i>	YHUM454	<i>MATα</i>	<i>mid2Δ::NatNT2</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MID2</i> durch homologe Rekombination (Janke <i>et al.</i> , 2004); Primer: <i>mid2_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS134
YHUM2532/ YHUM2533	<i>mtl1Δ</i>	YHUM454	<i>MATα</i>	<i>mtl1Δ::NatNT2</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MTL1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS134
YHUM2534/ YHUM2535	<i>wsc3Δ</i>	YHUM454	<i>MATα</i>	<i>wsc3Δ::NatNT2</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC3</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc3_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS134
YHUM2536	<i>wsc2Δ</i>	YHUM454	<i>MATα</i>	<i>wsc2Δ::NatNT2</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc2_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS134
YHUM2537/ YHUM2538	<i>mid2Δ mtl1Δ</i>	YHUM2530	<i>MATα</i>	<i>mid2Δ::NatNT2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MTL1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2539/ YHUM2540	<i>mid2Δ mtl1Δ</i>	YHUM2531	<i>MATα</i>	<i>mid2Δ::NatNT2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MTL1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2541/ YHUM2542	<i>wsc1Δ</i>	YHUM0454	<i>MATα</i>	<i>wsc1Δ::NatNT2</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS134
YHUM2543/ YHUM2544	<i>wsc2Δ wsc3Δ</i>	YHUM2536	<i>MATα</i>	<i>wsc2Δ::NatNT2</i> <i>wsc3Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC3</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc3_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2561		YHUM0477	<i>MATα</i>	<i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MTL1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2562/ YHUM2563		YHUM0476	<i>MATα</i>	<i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MTL1</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2564		YHUM0476	MAT α	<i>wsc2Δ::his3MX6 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc2_s1</i> und <i>wsc2_s2</i> , Matrize: pFA6-his3MX
YHUM2578		YHUM0477	MAT α	<i>wsc2Δ::his3MX6 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>wsc2_s1</i> und <i>wsc2_s2</i> , Matrize: pFA6-his3MX
YHUM2580		YHUM0476	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MID2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mid2_s1</i> und <i>mid2_s2</i> , Matrize: pFA6-kanMX6
YHUM2582/ YHUM2583		YHUM0477	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MID2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mid2_s1</i> und <i>mid2_s2</i> , Matrize: pFA6-kanMX6
YHUM2619		YHUM2561; YHUM2580	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Kreuzen der Ursprungsstämme mit anschließender Sporulation und
YHUM2621		YHUM2561; YHUM2580	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Tetradendissektion Kreuzen der Ursprungsstämme mit anschließender Sporulation und Tetradendissektion
YHUM2627/ YHUM2628		YHUM0477	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC1</i> durch homologe Rekombination; Primer: S1pRS_wsc1 und S2pRS_wsc1 Matrize: pRS406
YHUM2629		YHUM0477	MAT α	<i>wsc3Δ::LEU2 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC3</i> durch homologe Rekombination; Primer: S1pRS_wsc3 und S2pRS_wsc3 Matrize: pRS405
YHUM2630/ YHUM2631		YHUM0476	MAT α	<i>wsc3Δ::LEU2 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC3</i> durch homologe Rekombination; Primer: S1pRS_wsc3 und S2pRS_wsc3 Matrize: pRS405
YHUM2632		YHUM0476	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC1</i> durch homologe Rekombination; Primer: S1pRS_wsc1 und S2pRS_wsc1 Matrize: pRS406
YHUM2646		YHUM2621; YHUM2578	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 wsc2Δ::his3MX6 ura3Δ leu2Δ his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2649		YHUM2619; YHUM2564	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Kreuzen der Ursprungsstämme mit anschließender Sporulation und Tetradendisektion
YHUM2660/ YHUM2661		YHUM2627; YHUM2564	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2666		YHUM2630; YHUM2578	MAT α	<i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2673		YHUM2629; YHUM2564	MAT α	<i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2675		YHUM2646; YHUM2630	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2677		YHUM2649; YHUM2631	MAT α	<i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2679		YHUM2629; YHUM2661	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2681		YHUM2629; YHUM2660	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2750/ YHUM2755		YHUM2562; YHUM2679	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2761		YHUM2580; YHUM2627	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2762		YHUM2583; YHUM2632	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2764/ YHUM2765	P-MID2	YHUM2750	MAT α	<i>natNT2-Padh-MID2</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Der <i>ADH</i> -Promotor aus pYM-N7 wurde n-terminal von <i>MID2</i> chromosomal durch homologe Rekombination integriert (Janke <i>et al.</i> , 2004), Primer: mid2_s1 und -s4_new, Matriz: pYM-N7
YHUM2778		YHUM2762; YHUM2629	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Kreuzen der Ursprungsstämme mit anschließender Sporulation und Tetradendisektion
YHUM2779		YHUM2761; YHUM2629	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2780		YHUM2761; YHUM2578	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::ΔHIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2782		YHUM2761; YHUM2578	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::ΔHIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2785	MTL1	YHUM2762; YHUM2673	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2786	MTL1	YHUM2762; YHUM2673	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2787	MTL1	YHUM2762; YHUM2673	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	
YHUM2788	MTL1	YHUM2762; YHUM2673	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2789	MID2	YHUM2561; YHUM2681	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Kreuzen der Ursprungsstämme mit anschließender Sporulation und Tetradendisektion
YHUM2790	MID2	YHUM2561; YHUM2681	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2791	MID2	YHUM2562; YHUM2679	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2792	MID2	YHUM2562; YHUM2679	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2797		YHUM2779, YHUM2561	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2801/ YHUM2802		YHUM2782, YHUM2563	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::ΔHIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2803		YHUM2778, YHUM2563	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	
YHUM2805		YHUM2782, YHUM2563	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::ΔHIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MID2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mid2_s1</i> und <i>mid2_s2</i> , Matrize: pFA6-kanMX6
YHUM2822/ YHUM2823	-5	YHUM2755	MAT α	<i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::ΔHIS3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ leu2Δ</i> <i>his3Δ trp1Δ</i>	diese Arbeit	

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2829/ YHUM2830	flo11Δ	YHUM0462	MATa	<i>flo11Δ::hphNT1 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>FLO11</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>flo11_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2831/ YHUM2832	flo11Δ	YHUM0463	MATα	<i>flo11Δ::hphNT1 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>FLO11</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>flo11_s1</i> und <i>_s2</i> , Matrize: pKS133
YHUM2893/ YHUM2894	-5	YHUM2791	MATa	<i>wsc1Δ::URA3 wsc2::ΔHIS3 wsc3Δ::LEU2 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>MID2</i> durch homologe Rekombination; Primer: <i>mid2_s1</i> und <i>mid2_s2</i> , Matrize: pFA6-kanMX6
YHUM2895/ YHUM2896	WSC1	YHUM2675	MATa	<i>mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 wsc2Δ::his3MX6 wsc3Δ::LEU2 ura3Δ::URA3 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>URA3</i> aus BHUM3097 (verdaut mit HindIII) wurde am <i>URA3</i> Locus integriert
YHUM2897/ YHUM2898	WSC2	YHUM2803	MATa	<i>wsc1Δ::URA3 wsc3Δ::LEU2 his3Δ::HIS3 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ0 leu2Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>HIS3</i> aus BHUM3098 (verdaut mit BamHI) wurde am <i>HIS3</i> Locus integriert
YHUM2899/ YHUM2900	WSC3	YHUM2802	MATa	<i>wsc1Δ::URA3 wsc2Δ::HIS3 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 leu2Δ::LEU2 ura3Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>LEU2</i> von pRS405 (PCR mit Primer liFlankeLEU2_s1 und reFlankeLeu2_s2) wurde am <i>LEU2</i> Locus integriert
YHUM2901/ YHUM2902	WSC1	YHUM2677	MATα	<i>mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 wsc2Δ::his3MX6 wsc3Δ::LEU2 ura3Δ::URA3 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>URA3</i> aus BHUM3097 (verdaut mit HindIII) wurde am <i>URA3</i> Locus integriert
YHUM2903/ YHUM2904	WSC2	YHUM2797	MATα	<i>wsc1Δ::URA3 wsc3Δ::LEU2 his3Δ::HIS3 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ0 leu2Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>HIS3</i> aus BHUM3098 (verdaut mit BamHI) wurde am <i>HIS3</i> Locus integriert
YHUM2905/ YHUM2906	WSC3	YHUM2805	MATα	<i>wsc1Δ::URA3 wsc2Δ::HIS3 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 leu2Δ::LEU2 ura3Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>LEU2</i> von pRS405 (PCR mit Primer liFlankeLEU2_s1 und reFlankeLeu2_s2) wurde am <i>LEU2</i> Locus integriert

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2907/ YHUM2908	P-WSC1	YHUM2901	MAT α	<i>natNT2-Padh-WSC1</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ::URA3</i> <i>leu2Δ0 his3Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Der <i>ADH</i> -Promotor aus pYM-N7 wurde n-terminal von <i>WSC1</i> chromosomal durch homologe Rekombination integriert (Janke <i>et al.</i> , 2004), Primer: <i>wsc1_s1</i> und <i>-s4_new</i> , Matrize: pYM-N7
YHUM2909/ YHUM2910	P-WSC2	YHUM2903	MAT α	<i>natNT2-Padh-WSC2</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>his3Δ::HIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Der <i>ADH</i> -Promotor aus pYM-N7 wurde n-terminal von <i>WSC2</i> chromosomal durch homologe Rekombination integriert; Primer: <i>wsc2_s1</i> und <i>-s4_new</i> , Matrize: pYM-N7
YHUM2911/ YHUM2912	P-WSC3	YHUM2905	MAT α	<i>natNT2-Padh-WSC3</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::HIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>leu2Δ::LEU21</i> <i>ura3Δ0 his3Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Der <i>ADH</i> -Promotor aus pYM-N7 wurde n-terminal von <i>WSC3</i> chromosomal durch homologe Rekombination integriert; Primer: <i>wsc3_s1</i> und <i>-s4_new</i> , Matrize: pYM-N7
YHUM2913/ YHUM2914	P-MTL1	YHUM2786	MAT α	<i>natNT2-Padh-MTL1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Der <i>ADH</i> -Promotor aus pYM-N7 wurde n-terminal von <i>MTL1</i> chromosomal durch homologe Rekombination integriert; Primer: <i>mtl1_s1</i> und <i>-s4_new</i> , Matrize: pYM-N7
YHUM2915/ YHUM2916	WSC1-NG	YHUM2901	MAT α	<i>WSC1-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ::URA3</i> <i>leu2Δ0 his3Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>WSC1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>wsc1_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290
YHUM2917/ YHUM2918	WSC2-NG	YHUM2903	MAT α	<i>WSC2-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>his3Δ::HIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	<i>WSC2</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>wsc2_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2919/ YHUM2920	WSC3-NG	YHUM2905	MAT α	WSC3- <i>mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::HIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>leu2Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ0 his3Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	WSC3 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>wsc3_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290
YHUM2921/ YHUM2922	MID2-NG	YHUM2789	MAT α	MID2- <i>mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	MID2 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>mid2_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290
YHUM2923/ YHUM2924	MTL1-NG	YHUM2786	MAT α	MTL1- <i>mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	MTL1 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>mtl1_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290
YHUM2925/ YHUM2926	P-WSC1-NG	YHUM2907	MAT α	<i>natNT2-Padh-</i> WSC1- <i>mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>wsc2Δ::his3MX6</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>ura3Δ::URA3</i> <i>leu2Δ0 his3Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	WSC1 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>wsc1_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290
YHUM2927/ YHUM2928	P-WSC2-NG	YHUM2909	MAT α	<i>natNT2-Padh-</i> WSC2- <i>mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::URA3</i> <i>wsc3Δ::LEU2</i> <i>his3Δ::HIS3</i> <i>mid2Δ::kanMX6</i> <i>mtl1Δ::hphNT1</i> <i>ura3Δ0 leu2Δ0</i> <i>trp1Δ0</i>	diese Arbeit	WSC2 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: <i>wsc2_s2</i> und <i>_s3</i> , Matrize: BHUM3290

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2929/ YHUM2930	P-WSC3-NG	YHUM2911	MAT α	<i>natNT2-Padh-WSC3-mNEONGREEN::k ITRP1 wsc1Δ::URA3 wsc2Δ::HIS3 mid2Δ::kanMX6 mtl1Δ::hphNT1 leu2Δ::LEU21 ura3Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	WSC3 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: wsc3_s2 und _s3, Matrize: pAL35
YHUM2931/ YHUM2932	P-MID2-NG	YHUM2764	MAT α	<i>natNT2-Padh-MID2-mNEONGREEN::k ITRP1 wsc1Δ::URA3 wsc2Δ::his3MX wsc3Δ::LEU2 mtl1Δ::hphNT1 ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	MID2 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: mid2_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2933/ YHUM2934	K+WSC1-NG	YHUM0463	MAT α	<i>WSC1-mNEOMGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	WSC1 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: wsc1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2935/ YHUM2936	K+WSC2-NG	YHUM0463	MAT α	<i>WSC2-mNEONGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	WSC2 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: wsc2_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2937/ YHUM2938	K+WSC3-NG	YHUM0463	MAT α	<i>WSC3-mNEONGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	WSC3 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: wsc3_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2939/ YHUM2940	K+MID2-NG	YHUM0463	MAT α	<i>MID2-mNEONGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	MID2 wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: mid2_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290

Stammsname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2941/ YHUM2942	K+MTL1-NG	YHUM0463	MAT α	<i>MTL1-mNEONGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>MTL1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: mtl1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2955/ YHUM2956	slt2 Δ	YHUM0463	MAT α	<i>slt2Δ::NatNT2 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>SLT2</i> durch homologe Rekombination; Primer: slt2_s1 und _s2, Matrize: pKS134
YHUM2957/ YHUM2958	wsc1 Δ	YHUM0463	MAT α	<i>wsc1Δ::NatNT2 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC1</i> durch homologe Rekombination; Primer: wsc1_s1 und _s2, Matrize: pKS134
YHUM2959/ YHUM2960	wsc1 Δ	ESM356-1	MAT α	S288C <i>wsc1Δ::NatNT2 ura3-53 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>WSC1</i> durch homologe Rekombination; Primer: wsc1_s1 und _s2, Matrize: pKS134
YHUM2961/ YHUM2962	slt2 Δ	ESM356-1	MAT α	S288C <i>slt2Δ::NatNT2 ura3-53 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>SLT2</i> durch homologe Rekombination; Primer: slt2_s1 und _s2, Matrize: pKS134
YHUM2963/ YHUM2964	kdx1 Δ	YHUM0463	MAT α	<i>kdx1Δ::hphNT1 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>KDX1</i> durch homologe Rekombination; Primer: kdx1_s1 und _s2, Matrize: pKS133
YHUM2965/ YHUM2966	slt2 Δ kdx Δ	YHUM2955	MAT α	<i>slt2Δ::NatNT2 kdx1Δ::hphNT1 trp1Δ0</i>	diese Arbeit	Knock-out von <i>KDX1</i> durch homologe Rekombination; Primer: kdx1_s1 und _s2, Matrize: pKS133
YHUM2967/ YHUM2968	Rlm1-NG	YHUM0463	MAT α	<i>RLM1-mNEONGREEN::k ITRP1 trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2969/ YHUM2970	wsc1 Δ Rlm1-NG	YHUM2957	MAT α	<i>RLM1-mNEONGREEN::k ITRP1 wsc1Δ::NatNT2 trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2971/ YHUM2972	slt2Δ Rlm1-NG	YHUM2955	MATα	<i>RLM1-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>slt2Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2973/ YHUM2974	Rlm1-NG	ESM356-1	MATα	<i>S288C</i> <i>RLM1-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2975/ YHUM2976	wsc1Δ Rlm1-NG	YHUM2959	MATα	<i>RLM1-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2977/ YHUM2978	slt2Δ Rlm1-NG	YHUM2961	MATα	<i>RLM1-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>slt2Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>RLM1</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: rlm1_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2979/ YHUM2780	Swi4-NG	YHUM0463	MATα	<i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2981/ YHUM2982	wsc1Δ Swi4-NG	YHUM2957	MATα	<i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2983/ YHUM2984	slt2Δ Swi4-NG	YHUM2955	MATα	<i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>slt2Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2985/ YHUM2986	Swi4-NG	ESM356-1	MAT α	S288C <i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2987/ YHUM2988	wsc1 Δ Swi4-NG	YHUM2959	MAT α	<i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2989/ YHUM2990	slt2 Δ Swi4-NG	YHUM2961	MAT α	<i>SWI4-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>slt2Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI4</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi4_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2991/ YHUM2992	Swi6-NG	YHUM0463	MAT α	<i>SWI6-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI6</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2993/ YHUM2994	wsc1 Δ Swi6-NG	YHUM2957	MAT α	<i>SWI6-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>wsc1Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI6</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2995/ YHUM2996	slt2 Δ Swi6-NG	YHUM2955	MAT α	<i>SWI6-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>slt2Δ::NatNT2</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI6</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM2997/ YHUM2998	Swi6-NG	ESM356-1	MAT α	S288C <i>SWI6-mNEONGREEN::k</i> <i>ITRP1</i> <i>trpΔ0</i>	diese Arbeit	<i>SWI6</i> wurde c-terminal mit einer <i>mNEONGREEN</i> -Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290

Stammname	verwendete Bezeichnung	Ursprungsstamm	MAT	Genotyp	Referenz	Herstellung
YHUM2999/ YHUM3000	wsc1Δ Swi6-NG	YHUM2959	MATa	SWI6- mNEONGREEN::k ITRP1 wsc1Δ::NatNT2 trpΔ0	diese Arbeit	SWI6 wurde c-terminal mit einer mNEONGREEN-Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290
YHUM3001/ YHUM3002	slt2Δ Swi6-NG	YHUM2961	MATa	SWI6- mNEONGREEN::k ITRP1 slt2Δ::NatNT2 trpΔ0	diese Arbeit	SWI6 wurde c-terminal mit einer mNEONGREEN-Markierung aus BHUM3290 chromosomal versehen; Primer: swi6_s2 und _s3, Matrize: BHUM3290

4.8.3 Plasmide

Tabelle 15: Verwendete und hergestellte Plasmide

Name	verwendete Bezeichnung	Rückgrat/Genotyp	Referenz	Herstellung
pFA6a-natNT2	pKS134	<i>Amp^R; P_{FA6a}-NatNT2</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)	
pFA6a-hphNT1	pKS133	<i>Amp^R; PFA6a-hphNT1</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)	
pFA6-HISMX6		<i>Amp^R; kIHIS3MX6</i>	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	
pFA6-kanMX6		<i>Amp^R; kanMX6</i>	(Bähler <i>et al.</i> , 1998)	
pYM-N7		<i>Amp^R; NatNT2-P_{adh}</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)	
pYM29		<i>Amp^R; eGFP::kITRP1</i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)	
pCR95		<i>Amp^R; mNeonGreen::NatNT2</i>	(Lutz <i>et al.</i> , 2018)	
pRS405		<i>Amp^R; LEU2; integrativ</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)	
pRS406		<i>Amp^R; URA3; integrativ</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)	
pRS314		<i>Amp^R; TRP; CEN</i>	(Sikorski & Hieter, 1989)	
BHUM3097		<i>Amp^R; URA3</i>	Datenbank AG Mösch	
BHUM3098		<i>Amp^R; HIS3</i>	Datenbank AG Mösch	

Name	verwendete Bezeichnung	Rückgrat/Genotyp	Referenz	Herstellung
BHUM3290	pAL35-4	pYM29/ <i>mNeonGreen::klTRP1</i>	diese Arbeit	Durch in- <i>E. coli</i> -Ligation: mNeonGreen wurde mittels PCR amplifiziert (Matrize: pCR95, Primer: pCR95_YFP_pYM_aqua_rev_NEU und pYM_MC_fwd) und in pYM29 eingefügt (eGFP durch BamHI/Sal1 Restriktionsverdau entfernt)
BHUM3291/ BHUM3292	WSC1	pRS314/ <i>WSC1</i>	diese Arbeit	Durch in- <i>E. coli</i> -Ligation: pRS314 geschnitten mit BamHI/EcoRI, WSC1 wurde aus dem Genom amplifiziert mit Primer WSC1_in_pRS314_up_NEU2 und WSC1_in_pRS314_down_rev
BHUM3293/ BHUM3294	WSC1 ^{Y22A Y24A Y107A}	pRS314/ <i>WSC1</i> ^{Y22A Y24A Y107A}	diese Arbeit	hergestellt durch ortsspezifische Mutagenese von WSC1 Primer: WSC1_Y22A Y24A und WSC1_Y22A Y24A_rev; WSC1_Y107A und WSC1_Y107A_rev
BHUM3295/ BHUM3296	WSC1 ^{Y64A Y70A Y104A}	pRS314/ <i>WSC1</i> ^{Y64A Y70A Y104A}	diese Arbeit	hergestellt durch ortsspezifische Mutagenese von WSC1 Primer: WSC1_Y64A und WSC1_Y64A_rev; WSC1_Y70A und WSC1_Y70A_rev; WSC1_Y104A und WSC1_Y104A_rev
BHUM3297/ BHUM3298	WSC1 ^{Y41A W43A Y89A F91A Y93A}	pRS314/ <i>WSC1</i> ^{Y41A W43A Y89A F91A Y93A}	diese Arbeit	hergestellt durch ortsspezifische Mutagenese von WSC1 Primer: WSC1_Y41A W43A und WSC1_Y41A W43A_rev; WSC1_Y89A F91A Y93A und WSC1_Y89A F91A Y93A_rev
BHUM3299/ BHUM3300	WSC1 ^{Y60A}	pRS314/ <i>WSC1</i> ^{Y60A}	diese Arbeit	hergestellt durch ortsspezifische Mutagenese von WSC1 Primer: WSC1_Y60A und WSC1_Y60A_rev
BHUM3301/ BHUM3302	WSC1 ^{ΔCRD}	pRS314/ <i>WSC1</i> ^{ΔCRD}	diese Arbeit	hergestellt durch ortsspezifische Mutagenese von WSC1 Primer: WSC_Domäne_ko_rev und WSC_Domäne_ko_fwd_NEU

Name	verwendete Bezeichnung	Rückgrat/Genotyp	Referenz	Herstellung
BHUM3303	WSC1-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	Durch in-Hefe-Ligation mit drei PCR-Fragmenten: Fragment 1: Matrize: pCR95, Primer: Wsc1-tag_fwd und Wsc1-ypmYFP_rev; Fragment 2: Matrize: WSC1 (oder Punktmutanten), Primer: Wsc1_pRS_tag_rev und Aq_pRS314_fwd; Fragment 3: Matrize: WSC1 (oder Mutanten), Primer Wsc1_pRS_tag_fwd und Aq_pRS314_rev
BHUM3304	Y22A Y24A Y107A-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1^{Y22A Y24A Y107A}-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	
BHUM3305	Y64A Y70A Y104A-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1^{Y64A Y70A Y104A}-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	
BHUM3306	Y41A W43A Y89A F91A Y93A-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1^{Y41A W43A Y89A F91A Y93A}-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	
BHUM3307	Y60A-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1^{Y60A}-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	
BHUM3308	ΔCRD-NG	<i>Amp; TRP; CEN</i> <i>WSC1^{ΔCRD}-mNeonGreen</i>	diese Arbeit	

4.9 Oligonukleotide

Tabelle 16: Verwendete Oligonukleotide („Primer“)

Name	Sequenz	Verwendung
wsc1_s1	ATAGTACGTTGGCTGATTTAGTACTCAGGATAAAAAATTCTATTTA AATAATGCGTACGCTGCAGGT	n-terminale Markierung Gendeletion
wsc1_s2	CTTGCTTGGCAATAGTTTAAGAATATAATAATTTTTTTGGGTTTCT TCAATCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung Gendeletion
wsc1_s3	CAGGAGGGAAAAACAACGTTTTTAACAGTGTTCAATCCAGACGAAG CTGATCGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
wsc1-s4_new	GATAAAATGGATAATAACGCCAGAAGCAGACTTGTTTTGTTCCGGT CTCATCGATGAATTCCTGTGCG	n-terminale Markierung
wsc2_s1	TGTTTCTTCTTTGAATTTCTTTTGACCAACAGCATTATAGAAGTGG AATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	n-terminale Markierung Gendeletion
wsc2_s2	GAATAAGTCTTTGATATGAATATGTAGTGTGGTATCTAAACCTAG TCAATCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung Gendeletion
wsc2_s3	TGATGATGATTACGATGATGCAAAGGATTCCAATAATAGTTCTTTG CGCCGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
wsc2-s4_new	GTATATATATGAGCCACACTAAGATGAAGGACTTGTGTATGAGAT CTAGCTGCATCGATGAATTCCTGTGCG	n-terminale Markierung
wsc3_s1	ATGAAATTCATGTCCGTATAGTTTGTTTTTTAGCAGAAGACAATAT AAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	n-terminale Markierung Gendeletion
wsc3_s2	GCAGAACCGATTGATTACCATTAAATGTTGAGAGTTTATGCGAGTTT TTCAATCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung Gendeletion
wsc3_s3	GATAATCCTGATAATCCTGAATTATCTAGTACCGTATCTCATAATCG AGCCGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
wsc3-s4_new	GATTTTAATAGTTCTTTTATTTGTTAATTTTGCAAACCACTCTTTC CATCGATGAATTCCTGTGCG	n-terminale Markierung

Name	Sequenz	Verwendung
mid2_s1	TTTCGCTACTTTTCGTTGAAGATTGGACATATAAAATACGCAAATCA TAGTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	n-terminale Markierung Gendeletion
mid2_s2	GAATGAAAAGTAGCCATAAGCACTAAATGATATGAATGGATATGA TTAATCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung Gendeletion
mid2_s3	GAAAAATTCTATGATGAACAAGGTAACGAATTATCACCACGAAATT ATCGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
mid2-s4_new	GTATTAAGTAATAAGCGGAACTATTCTTGGTTGTGAAAGACA ACATCGATGAATTCTCTGTCG	n-terminale Markierung
mtl1_s1	GTTTCCACTTTTAACTTACTCCAGTTAGTATAATATAAGTAGTTAA GGTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	n-terminale Markierung Gendeletion
mtl1_s2	GATTTTAAGAAGAAAAGTTATGGCAAAGCTCTTCGCTATGATTT AATCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung Gendeletion
mtl1_s3	GAGAACTATTACAGAAACCAACAACGGCTTAAATATCACGAAC TATCGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
mtl1-s4_new	GAACCAACTCTGCGAAAGAACTTAGCGGTAGAGTTGTTAACG CCATCGATGAATTCTCTGTCG	n-terminale Markierung
wsc1_tag	GTCACGAACACCATCACGGC	Test-PCR Markierung
wsc2_tag	GCCAATCTTCTCAGCATGTG	Test-PCR Markierung
wsc3_tag	GGAGGAGACGGAAATCGCAC	Test-PCR Markierung
mid2_tag	CAGCAACCGCTGATTCAAGC	Test-PCR Markierung
mtl1_tag	GACGGTAAATGTGCACAGC	Test-PCR Markierung
wsc1_ko	CAGTTTACACAGCAGCGCTTG	Test-PCR Gendeletion, n-terminale Markierung
wsc2_ko	CATTCTTGATTTGGTCATCTG	Test-PCR Gendeletion, n-terminale Markierung
wsc3_ko	CTATCCATATTACATCTGAAC	Test-PCR Gendeletion, n-terminale Markierung
mid2_ko	CAGAAGGAGCACCGTTAGATG	Test-PCR Gendeletion, n-terminale Markierung
mtl1_ko	GATCTGGAAGTACAATGATG	Test-PCR Gendeletion, n-terminale Markierung
pRS306_(p)Ura_test	CTTCTGTTCGGAGATTACCG	Test-PCR Gendeletion
pRS405_(p)Leu_test	GAATACAGGTAAGCAAATTGATAC	Test-PCR Gendeletion
S1pRs_wsc1	GTACGTTGGCTGATTTAGTACTCAGGATAAAAAATTCTATTTAAAT AATGAGATTGTACTGAGAGTGCAC	Gendeletion
S2pRS_wsc1	CTTGCTTGGCAATAGTTTAAGAATATAATAATTTTTTTGGGTTTCT TCACTGTGCGGTATTTACACCG	Gendeletion
S1pRS_wsc3	GAAATTCATGTCCGTATAGTTTGTGTTTTTAGCAGAAGACAATATA AAATGAGATTGTACTGAGAGTGCAC	Gendeletion
S2pRS_wsc3	GCAGAACCAGTTGATTACCATTAATGTTGAGAGTTTATGCGAGTTT TCACTGTGCGGTATTTACACCG	Gendeletion
liFlankeLEU2_s1	CTCAAAAAGATCCATGTATAATCTTCATTATTACAGCCCTCTGAAG ATTGTACTGAGAGTGCAC	Amplifikation von <i>LEU2</i> von pRS405 mit homologen Sequenzen für homologe Rekombination

Name	Sequenz	Verwendung
reFlankeLeu2_s2	GTATGTAGATTGCGTATATAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCC TGTGCGGTATTTACACCG	Amplifikation von <i>LEU2</i> von pRS405 mit homologen Sequenzen für homologe Rekombination
flo11_s1	TCTAATTAATAATATACTTTTGTAGGCCTCAAAAATCCATATACGCAC ACTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Gendeletion
flo11_s2	TAAGAATGAAAACATCGTAATGAAGAAACGAACATGTTGGAATTG TATCATTAAATCGATGAATTCGAGCTCG	Gendeletion
flo11-ko	GACCGCTGAGCAATTTAAAGC	Test-PCR Gendeletion
klTRP1-testprimer_rev	GCTATTCATCCAGCAGGCC	Test-PCR Markierung, Sequenzierung
wsc1_in_pRS314_down_r ev	CCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCCTCGTTACTTC CAGCTCTCCAG	Amplifikation von <i>WSC1</i> aus Genom für in-Hefe- Ligation
WSC1_in_pRS314_up_NE U2	AGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGGGAAGCAGATA TCATCGGCC	Amplifikation von <i>WSC1</i> aus Genom für in-Hefe- Ligation
pYM_MC_fwd	GACACTATAGAACGCGGCCGCCAGCTGAAG	Amplifikation von <i>mNEONGREEN</i> aus pCR95 für in- <i>E. coli</i> -Ligation
pCR95_YFP_pYM_aqua_r ev_NEU	GAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGTTCGCTTATTTAGAAGTGG CGCGCCTCGA	Amplifikation von <i>mNEONGREEN</i> aus pCR95 für in- <i>E. coli</i> -Ligation
WSC_Domäne_ko_rev	GCTATTTGTGTCAGGTTGCTTGCATAAAATGG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC_Domäne_ko_fwd_N EU	CGCAAGCGAACTCTGACACAAATAGCAATAGC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y22A Y24A	CAAGCGAACGCCGCGGAAGCCGTGAATTGTTTTAG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y22A Y24A_rev	CTAAAACAATTCACGGCTTCCGCGGCGTTCGCTTG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y107A	GATGCCTATTCTGTGGCCCACTTGACTCTGAC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y107A_rev	GTCAGAGTCAAGTTGGGCCACAGAATAGGCATC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y41A W43A	CAAAGGCCGATTAGCTAACGCGCAGTCGAGTTCACAC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y41A W43A_rev	GTGTGAACTCGACTGCGCGTTAGCTGAATCGGCCTTTG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y64A	GCTACTTTGCCCTTGCTAATCATTAGAATG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y64A_rev	CATTCTGAATGATTAGCAAGGGCAAAGTAGC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y70A	TAATCATTAGAATGTGCTTGTGGTGATACTAATC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y70A_rev	GATTAGTATCACCACAAGCACATTCTGAATGATTA	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y89A F91A Y93A	CTTCATGTAATACGGCTTGCCTGGTGCCAGCAGTGAGATGTG	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y89A F91A Y93A_rev	CACATCTCACTGCTGGCACCAGCGCAAGCCGTATTACATGAAG	Ortsspezifische Mutagenese

Name	Sequenz	Verwendung
WSC1_Y104A	GGTGGTGAAGATGCCGCTTCTGTGTACCAAC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y104A_rev	GTTGGTACACAGAAGCGGCATCTTCACCACC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y60A	CAAAAGGTGCAAGCGCCTTGGCCCTTATAATC	Ortsspezifische Mutagenese
WSC1_Y60A_rev	GATTATAAAGGGCAAAGGCGCTTGACCTTTTG	Ortsspezifische Mutagenese
Wsc1-tag_fwd	CAGTGGTCAATCCAGACGAAGCTGATCGTACGCTGCAGGTCGAC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
Wsc1-ympYFP_rev	GAATATAATAATTTTTTTGGGTTTCTTCACTTGTATAATTCATCCAT ACCCATAACATC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
Wsc1_pRS_tag_rev	ATCAGCTTCGTCTGGATTGAC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
Wsc1_pRS_tag_fwd	TGAAGAAACCCAAAAAAATTATTATATTCTTAAAC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
Aq_pRS314_fwd	GACAGCATCGTAATATATGTGTACTTTGC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
Aq_pRS314_rev	GCAAAGTACACATATATTACGATGCTGTC	In-Hefe-Ligation von WSC1-NG
slt2_s2	CTATGGTGATTCTATACTTCCCCGGTTACTTATAGTTTTTGTCTTAA TCGATGAATTCGAGCTCG	Gendeletion
slt2_s1	CAAATAGTAGAAATAATTGAAGGGCGTGTATAACAATTCTGGGA GCGTACGCTGCAGGTCGAC	Gendeletion
slt2_ko	CATCTAGAAGCCATCTATTTAG	Test-PCR Gendeletion
Hiskantag2	GCTGCGCACGTCAAGACTG	Test-PCR Gendeletion, Markierung
pRS316_seq	CTAATCAAGTTTTTTGGGGTC	Sequenzierung
pRS316_seq_rev	ATGACCATGATTACGCCAAG	Sequenzierung
pYMseq	GTCGTTAGAACGCGGCTAC	Sequenzierung
Pfa6a_seq_rev	GCCGCGCCGAACGACC	Sequenzierung
rlm1_s2	GTTTCTTATGCTTGGGAATATTCATACTGGTCAAATTTTTGGTTTAA TCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung
rlm1_s3	CTTTAATTTTTCGACTGATATTCAGGAGAAAAAATTCAAGCAAA ATACGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
rlm1_tag	CTATATCGATGTTTCCAGACTG	Test-PCR Markierung
swi6_s2	CAAAATAAGTCATAAAAGTTAATGCAATGAAATCACATGCCCTCAA TCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung
swi6_s3	CATTGACACTGACGAAATGCAAGATTTTTTAAAAAAGCATGCTTCA CGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
swi6_tag	G TTCAGGTATTGATTGGGACTC	Test-PCR Markierung
swi4-s2	TGATAATAGTAAAAATTATTGGTACATTGTGAATTTAAATTTAA TCGATGAATTCGAGCTCG	c-terminale Markierung
swi4-s3	GACTCAAAATTGGACGATATAGAAAAGGATTGAGGGCAAACGCA CGTACGCTGCAGGTCGAC	c-terminale Markierung
swi4-tag	CAATTCAAAGTCAACGTCG	Test-PCR Markierung

Name	Sequenz	Verwendung
kdx1_s1	CCAAATGGGGCACTAAATGGCGTTTATTTATATGAAGAACTAATGC GTACGCTGCAGGTCGAC	Gendeletion
kdx1_s2	GTATATGTGCGCACCTATTAGTTGTGGTTTTCTGCTACAAAAATTTA ATCGATGAATTCGAGCTCG	Gendeletion
kdx1_ko	CTAAAGGTGACTTACCGCCAG	Test-PCR Gendeletion

5 Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme (Tabelle 13) wurden entweder in flüssigem LB-, oder auf festem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Enthielten die Stämme Plasmide (Tabelle 15), wurde dem Medium zur Selektion auf die Plasmide 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme (Tabelle 14) wurden je nach Experiment entweder in YPD-, SC-, LFM-, NGS-, GNA- oder SLAD Flüssigmedium oder auf Platten bei 30 °C oder RT angezogen (Tabelle 11). Auf Platten wurden die Stämme 2 bis 14 Tage inkubiert. Bei Flüssigkulturen unterscheidet man Vor- und Hauptkulturen. Vorkulturen wurden über Nacht schüttelnd inkubiert, Hauptkulturen wurden je nach Experiment 4 bis 6 h bei RT oder 30 °C ebenfalls schüttelnd inkubiert. Hauptkulturen wurden 1/10 aus den Vorkulturen in das jeweilige frische Medium verdünnt. Das Wachstum der Zellen konnte durch Messen der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt werden. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei ca. 1,5 x 10⁷ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986).

5.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

Für eine Lagerung der *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Stämme wurden Dauerkulturen angelegt, die bei -80 °C gelagert wurden. Für eine *E. coli*-Dauerkultur wurden 500 µl ÜN-Kultur mit 500 µl 60 % Glycerin gemischt. Für die *S. cerevisiae*-Dauerkulturen wurden die Stämme zunächst großflächig auf YPD-Platten ausgestrichen, 2 – 3 Tage bei 30 °C inkubiert und dann die gewachsenen Zellen in 1 ml YPD + 30 % Glycerin resuspendiert.

5.2 Präparation von DNA

5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse: nach (Birnboim & Doly, 1979)

Die *E. coli*-Kulturen, die die gewünschten Plasmide (Tabelle 15) trugen, wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin inkubiert. 1,5 ml der Kulturen wurden abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und die Pellets in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 und 150 µl Lösung 3 zugegeben (Tabelle 10). Die Lösungen wurden durch Invertieren gemischt und die Reaktionsgefäße 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) wurden die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt mit 1 ml EtOH gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei -20 °C und eine anschließende Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Die Pellets wurden getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O gelöst.

5.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA und Plasmiden aus *S. cerevisiae*

5.2.2.1 Isolation von Plasmiden mit „Plasmid Mini-Kit“

Für eine Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit (MACHEREY-NAGEL GMBH & CO. KG) verwendet. Eine Streichholzkopf-große Menge Hefezellen von Platte wurde in 250 µl Puffer A1 und 200 µl Glasperlen (0,25 – 0,5 mm) in einem Reaktionsgefäß resuspendiert. Das Gefäß wurde 5 min bei 4 °C auf einem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurde vorsichtig die Flüssigkeit mit möglichst wenigen Perlen entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 250 µl Puffer A2 zugegeben und nach einer Inkubation von 5 min auf RT 350 µl Puffer A3 zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min (13000 rpm). Der Überstand wurde auf ein Sälchen gegeben, zentrifugiert (60 s, 13000 rpm) und anschließend der Überstand verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer A4 gewaschen und zentrifugiert (60 s, 13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Säule erneut 60 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 25 µl ddH₂O auf die Säule gegeben, 1 min stehen gelassen und anschließend 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

5.2.2.2 Isolation der Gesamt-DNA mit der LiOAc-SDS Methode: nach (Löoke *et al.*, 2011)

Eine Streichholz-große Menge an Hefezellen wurden in einem Reaktionsgefäß in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf 70 °C, wurden 300 µl EtOH zugegeben und die Lösungen durch Vortexen gemischt. Die DNA wurde abzentrifugiert (3 min, 13000 rpm) und das Pellet mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl ddH₂O gelöst.

5.3 Manipulation von DNA

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) (Peake, 1989)

Mit Hilfe einer PCR können bestimmte DNA-Stücke amplifiziert werden. Man benötigt dafür geeignete Ausgangs-DNA, wie Gesamt-DNA oder Plasmid-DNA, spezifische Oligonukleotide, die komplementär zum 3'-Ende oder revers komplementär zum 5'-Ende des gewünschten DNA-Abschnittes sind. Die Hybridisierungstemperatur des PCR-Programms musste an den GC/AT-Gehalt der Oligonukleotide angepasst werden, sie reichte von ca. 50 °C – 70 °C. Um eine bessere Hybridisierung der Oligonukleotide zu erreichen, wurden diese, soweit möglich, mit einem C oder G am Ende versehen. Als Polymerasen wurden entweder Phusion- oder Taq-DNA-Polymerase verwendet. Für die Phusion galt eine Elongationszeit von 15''-30'' pro kb des DNA-Stückes und eine Elongationstemperatur von 68 °C. Bei der Taq-Polymerase betrug die Temperatur 72 °C und die einzustellende Elongationszeit ebenfalls 15''-30'' pro kb. Für weiter zu verwendende DNA-Stücke wurde die Phusion aufgrund ihrer Korrektur-Eigenschaft verwendet, für Test-PCRs die Taq-Polymerase.

5.3.1.1 PCR zur Amplifizierung von Chromosomalen Markierungs- und Deletionskassetten (Janke *et al.*, 2004)

Sollten Proteine mit einer C- oder N-terminalen Markierung versehen oder Gene deletiert werden, so wurden durch PCR Kassetten amplifiziert, die die gewünschte Markierung mit entsprechendem Selektionsmarker oder das bei der Deletion ersetzende Selektionsgen und homologe Bereiche zur gewünschten Position im Genom enthielten. Die gewünschten homologen Bereiche wurden durch die Oligonukleotide „Primer“ eingefügt. Für C-terminale Markierungen wurden S2- und S3-Primer verwendet, für das N-terminale Einfügen eines Promotor S1- und S4-Primer und für Deletionen S1- und S2-Primer (Tabelle 16) (Janke *et al.*, 2004).

Ein 100 µl PCR-Ansatz enthält:

1 µl	Plasmid-DNA
3,5 µl	dNTPs (10 mM)
Je 6,4 µl	Primer 1 und 2
10 µl	10 x SM-Puffer
3 µl	DMSO
67,7 µl	ddH ₂ O
2 µl	Phusion

Dieses PCR-Programm wurde verwendet:

	Aufheizen 98 °C	Hotstart –	Zugabe Phusion
	98 °C	3'	Denaturierung
10 x	98 °C	30''	Denaturierung
	58 °C	45''	Hybridisierung
	68 °C	3'	Elongation
20 x	98 °C	30''	Denaturierung
	58 °C	45''	Hybridisierung
	68 °C	3' + 20'' mehr je Zyklus	Elongation

5.3.1.2 Durchführen einer Test-PCR

Zur Überprüfung einer Gendeletion, einer erfolgreich eingefügten chromosomalen Markierung oder eines Promotors, wurde eine Test-PCR durchgeführt. Dafür wurden spezielle Test-Primer verwendet (Tabelle 16). Die Taq-Polymerase und der zugehörige Puffer stammten von NEB.

Ein 30 µl PCR-Ansatz enthält:

1 µl	Gesamt-DNA
0,6 µl	dNTPs (10 mM)
Je 3 µl	Primer 1 und 2
3 µl	Taq-Puffer
19,25 µl	ddH ₂ O
0,15 µl	Taq

Dieses PCR-Programm wurde verwendet:

35 x	95 °C	3'	Denaturierung
	95 °C	30''	Denaturierung
	56 °C	45''	Hybridisierung
	72 °C	3'	Elongation
	72 °C	10'	Elongation

5.3.2 Ortsspezifische Mutagenese: nach (Weiner *et al.*, 1994)

Mit der ortsspezifischen Mutagenese von Plasmid-DNA, können gezielt Punktmutationen eingefügt werden. Dafür wurden zur gewünschten DNA-Sequenz revers komplementäre Primer verwendet, welche die zu ändernden Basen enthielten. Diese wurde von 11 – 15 Basenpaaren flankiert. Das gesamte Plasmid wurde mit Hilfe der Primer und der Phusion-Polymerase amplifiziert.

Ein 50 µl PCR-Ansatz enthält:

1,5 µl	Plasmid-DNA
2 µl	dNTPs (10 mM)
Je 1 µl	Primer 1 und 2
5 µl	SM-Puffer
1,5 µl	DMSO
36,5 µl	ddH ₂ O
1,5 µl	Phusion

Dieses PCR-Programm wurde verwendet:

Aufheizen	98 °C	Hotstart –	Zugabe Phusion
	98 °C	3'	Denaturierung
15 x	98 °C	45''	Denaturierung
	55 °C	1'	Hybridisierung
	68 °C	2'	Elongation
	68 °C	5'	Elongation

Anschließend wurde die DNA gefällt (siehe 5.3.6.) und mit DpnI verdaut, um das Ursprungs-Plasmid zu eliminieren. Zur gefällten DNA wurden 17 µl ddH₂O, 2 µl Tango-Puffer und 1 µl DpnI zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Der komplette Ansatz wurde in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und die in den Kolonien enthaltenen Plasmide durch Sequenzierung überprüft (siehe 5.4.1.1. und 5.3.7.1.).

5.3.3 Restriktion von DNA

Für eine Restriktion von Plasmid-DNA wurden in einem 20 µl-Ansatz 2 µl Plasmid-DNA, 0,3 µl des oder der entsprechenden Enzyme und 2 µl des geeigneten Puffers gemischt. Die Differenz zu 20 µl wurde mit ddH₂O aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 1 - 3h bei 37 °C. Wurden größere Menge geschnittenes Plasmid benötigt, so wurden die Menge dementsprechend angepasst.

5.3.4 *In vivo* Ligation von DNA-Fragmenten

5.3.4.1 *In vivo* Ligation in *S. cerevisiae*: nach (Jansen *et al.*, 2005)

Durch *in vivo* Ligation können DNA-Fragmente ohne Enzyme direkt in Hefe zusammengefügt werden. Dies geschieht durch homologe Rekombination. Dabei können zwei oder mehr Fragmente zusammengeführt werden. Die Fragmente benötigen an ihren Enden homologe Bereiche zu den Stellen, an denen sie zusammengefügt werden sollen. Diese Bereiche sollten 30 - 40 bp lang sein und wurden durch PCR über Primer angefügt. Sollte ein Fragment durch *in vivo* Ligation in ein Plasmid eingefügt werden, dann musste dieses an der gewünschten Stelle durch Restriktionsenzyme aufgeschnitten werden und das einzubauende Fragment benötigte homologe Bereich zum Zielplasmid. Die zu ligierenden Fragmente wurden in ungefähr gleicher Menge (meist 5 – 15 µl) gleichzeitig in kompetente Hefezellen transformiert (siehe 5.4.1.2). Aus den erhaltenen Kolonien wurde dann die Plasmid-DNA präpariert (siehe 5.2.2.1). Von dieser wurden ca. 10 µl in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 5.4.1.1), aus denen dann die gewünschten Plasmide isoliert werden konnten.

5.3.4.2 *In vivo* Ligation in *E. coli* („Aqua Cloning“) (Beyer *et al.*, 2015)

Die *in vivo* Ligation in *E. coli* wurde vergleichbar wie in *S. cerevisiae* durchgeführt. Die mit homologen Enden ausgestatteten Fragmente wurden in ungefähr gleicher Menge gemischt. Anschließend wurde die Mischung 1 h bei RT inkubiert und anschließend direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 5.4.1.1).

5.3.5 Fällung von DNA mit Ethanol

Um in wässriger Lösung befindliche DNA zu fällen und anzukonzentrieren, wurde das zweifache Volumen EtOH zur Lösung gegeben und diese 10 min bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) pelletiert. Es folgte ein optionaler Waschschrift mit 1 ml 70 % EtOH. Die DNA wurde in gewünschter Menge ddH₂O gelöst.

5.3.6 Analyse von DNA

5.3.6.1 Sequenzierung von DNA: nach (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierungen wurden mittels Kettenabbruchmethode von der Firma MICROSYNTH AG durchgeführt. Dafür wurden 3 µl Plasmid-DNA mit 10 µl Tris-Puffer (pH 8,8; 25 mM) und 2 µl Primer (10 µM) gemischt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Sequencher 4.10.1 Demo“ (Tabelle 8).

5.3.6.2 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Stücken wurden 1 % Agarose-Gele in TAE-Puffer verwendet. Die Gele wurden in spezielle Schlitten gegossen, in die Kämme gesetzt wurden, die die gewünschte Anzahl an Taschen bildeten. Die zu untersuchende DNA wurde mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Längenstandart wurde der „Gene Ruler™ DNA Ladder Mix“ verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese zur Detektion in einem Färbegrad mit 0,01 % GelRed® und 50 mM EDTA gefärbt und anschließend wurde in einem dH₂O-Bad überschüssiger Farbstoff entfernt.

5.4 Manipulation von Mikroorganismen

5.4.1 Transformationsmethoden

5.4.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen: nach (Mandel & Higa, 1970)

Die *E. coli*-Zellen wurden über Nacht in LB-Medium angezogen und morgens wurde eine Hauptkultur (1/100 verdünnt; 500 ml) hergestellt. Diese wurde bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 erreicht wurde. Nach einer Inkubation der Kultur von 15 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 130 ml gekühlter RF1-Lösung gelöst und erneut 15 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm, 4 °C). Dieses Pellet wurde dann in 32 ml gekühltem RF2-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 100 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff Schock-gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für eine Transformation von Plasmid-DNA in die kompetenten Zellen wurden die gewünschte Anzahl von Aliquots auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 – 15 µl Plasmid-DNA zugegeben und die Mischung 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und eine weitere

Inkubation auf Eis für 2 min. Da für die Ampicillin-Resistenz kein Regenerationsschritt von Nöten war, wurden die Zellen direkt auf LB + Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen: nach (Knop *et al.*, 1999)

Die Hefezellen wurden über Nacht in 5 ml YPD bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Am Morgen wurde eine Hauptkultur angesetzt, indem 1 ml der Vorkultur in 50 ml frisches YPD gegeben wurde. Diese wurde 4 – 6 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Das Pellet wurde in 25 ml sterilem dH₂O und anschließend 10 ml LiSORB gewaschen (5 min, 1500 rpm, RT). Das Pellet wurde dann in 450 µl LiSORB resuspendiert und 50 µl frisch aufgekochte und abgekühlte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden in 50 µl aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Transformationen wurden entweder 5 – 20 µl PCR-Produkt oder 2 – 20 µl Plasmid-DNA zu den aufgetauten Aliquots gegeben und alles gemischt. Es wurden 300 µl LiPEG zugeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation von 20 min bei 42 °C und die Zellen wurden dann abzentrifugiert (3 min, 2000 rpm). Bei Antibiotika-Selektionsmarkern wurde das Pellet in 1 ml YPD resuspendiert und die Zellen 3 – 6 h bei 30 °C regeneriert. Bei Auxotrophie-Markern wurde das Pellet in 1 ml dH₂O gewaschen. Die gewaschenen und regenerierten Zellen wurden abzentrifugiert (3 min, 2000 rpm) und auf die geeigneten Platten ausplattiert. Die Platten wurden 2 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

5.4.2 Integration von DNA-Kassetten in das Genom von *S. cerevisiae* zur Erzeugung von Gendeletionen und -markierungen (Janke *et al.*, 2004)

Für die Deletion von Genen oder für die chromosomale Einbringung von C-terminalen Markierungen oder Promotoren wurden aus den jeweiligen Plasmiden (Tabelle 15) mit Primern, die lange Überhänge trugen, die passenden Kassetten mit verschiedenen Selektionskassetten amplifiziert. Die Überhänge waren dabei homolog zu den Bereichen im Genom, an denen die Kassetten eingesetzt werden sollten. Für die Amplifizierung wurden meist 5 PCR-Ansätze à 100 µl angesetzt (5.3.1.1) und diese wurden anschließend zusammengefügt und die DNA durch Fällung ankonzentriert (5.3.6.). Davon wurden 10 – 20 µl in kompetente Hefezellen transformiert (5.4.1.2.). Die erhaltenen Klone wurden durch eine Test-PCR verifiziert (5.3.1.2.).

5.4.3 Herstellung von Hefemutanten durch Kreuzung und Tetradendisektion

Für die Kreuzung der gewünschten Hefestämme wurden diese auf YPD-Platten in ungefähr gleicher Menge gemischt (*MATa* x *MATα*) und einen Tag bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen als „Patch“ auf eine GNA-Platte übertragen und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Eine möglichst große Menge

dieser Zellen wurden dann auf dünne NGS-Platten übertragen und so lange auf RT inkubiert, bis Sporen bzw. Tetraden unter dem Mikroskop zu erkennen waren. Die sporulierten Zellen wurden in 10 µl ddH₂O + 10 µl Lyticase (1 mg/ml) ca. 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 1 ml ddH₂O hinzugefügt. Von diesen Zellen wurden ca. 50 µl auf einer dünnen YPD strichförmig ausgestrichen und die Tetraden unter dem Tetradenmikroskop geteilt. Die Platten wurden ca. 3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend auf Platten mit den gewünschten Selektionsmarker repliziert, um positive Klone zu isolieren. Dabei wurde die richtige Markersegregation (2:2) kontrolliert. Es wurden nur Stämme aus kompletten Tetraden verwendet. Der Geschlechtstyp wurde durch Kreuzung gegen Testerstämme bestimmt (YHUM2747 [*MATa*] und YHUM2748 [*MATα*]).

5.5 Analyse von Proteinen

5.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die Western Blot Analyse: nach (Knop *et al.*, 1999)

Die Proteine wurden aus der Menge Zellen, die 1 OD₆₀₀ entspricht, extrahiert. Dafür wurden die Zellen mit 150 µl alkalischem Lysepuffer vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 55 % Trichloressigsäure (TCA) zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min (4 °C, 13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und 50 µl HU-Puffer zugegeben. Die Proben wurden 10 min bei 65 °C schüttelnd inkubiert und noch einmal zentrifugiert (3 min, 13000 rpm, RT). Es wurden 10 – 15 µl der oberen Phase auf ein SDS-Gel aufgetragen (5.5.2).

5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden selbst hergestellte 10 %ige SDS-Gele verwendet, auf die ein Sammelgel mit Taschen aufgegossen wurde (Tabelle 17).

Tabelle 17: Zusammensetzung der SDS-Gele

	10 % Trenngel	Sammelgel
1 M Tris/HCl, pH 8,8	3,75 ml	2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
dH₂O	2,5 ml	6,1 ml
30 % Acrylamid	3,4 ml	1,3 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	100 µl

Die Proteine wurden unter diskontinuierlichen und denaturierenden Bedingungen ca. 1 h 15 min bei 150 V aufgetrennt. Es wurde dafür SDS-Elektrophorese-Puffer verwendet. Als Größenstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ verwendet.

5.5.3 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot): nach (Towbin *et al.*, 1979)

Bei einem Western Blot werden zuvor aufgetrennte Proteine auf eine Membran übertragen. Dies dient dem Nachweis bestimmter Proteine mit ihrer Menge und Modifikationen in Zellextrakten. Es wurde ein Tank-Blot für die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf Nitrocellulose-Membran verwendet. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

Negativer Pol
Mit Transfer-Puffer getränktes Faserstoffpolster
„Blotting“-Papier
SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinen
Nitrocellulose-Membran
„Blotting“-Papier
Mit Transfer-Puffer getränktes Faserstoffpolster
Positiver Pol

Der Transfer lief für 12 h bei 12 V in gut gekühltem Transfer-Puffer. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft. Dafür wurden die Membranen 5 min in Ponceau S-Lösung gelegt und anschließend unter fließendem dH₂O überschüssiger Farbstoff entfernt, um das Bandenmuster zu analysieren. Nach einem kompletten Entfernen des Farbstoffes mit dH₂O, wurden die Membranen 30 – 60 min in TBST + 3 % Milchpulver schüttelnd inkubiert. Nach einem Waschschrift in TBST folgte die Inkubation der Membranen für 1 – 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in TBST + 3 % Milchpulver + Primärantikörper (Tabelle 9). Die Membranen wurden dann dreimal in ausreichend TBST gewaschen und anschließend für 1 h in TBST + 3 % Milchpulver + Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 9). Es folgten 6 Waschschriffe in TBST und die Entwicklung der Membranen. Dafür wurden die gewaschenen Membranen 1 min in frisch zubereiteter ECL-Lösung inkubiert, auf eine reflexionsarme Platte gelegt und mit Folie luftdicht abgedeckt. Die Chemolumineszenz wurde anschließend detektiert. Dabei hing die Expositionszeit von der jeweiligen Signalstärke ab.

Sollte die Membran noch mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden, so wurden sie zur Entfernung des aktuellen Antikörpers für 30 min bei 70 °C in Stripping-Puffer inkubiert. Der Puffer wurde durch sehr gründliches Waschen mit dH₂O entfernt.

Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit der Software ImageJ (Tabelle 8) (Schneider *et al.*, 2012).

5.5.4 Bestimmung der Proteinstabilität

Die Proteinstabilität wurde mittels „Cycloheximid Chase“ untersucht. Dafür wurden die 9MYC-markierten Zellen in YPD über Nacht angezogen und am nächsten Tag in eine Hauptkultur überführt. In der logarithmischen Phase der Zellen wurde den Kulturen Cycloheximid zugegeben (Endkonzentration: 200 µg/ml) und Proben entnommen. Dabei wurde zu den Zeitpunkten 0 h, 1 h, 2 h

und 3 h nach Zugabe je die Menge an Zellen entnommen, die 1 OD₆₀₀ entsprach. Daraus wurden die Proteine extrahiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt.

5.6 Untersuchung von *S. cerevisiae*

5.6.1 Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae*-Zellen

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hefestämme wurden diese in geeignetem LFM angezogen, um Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden. Für einfache Aufnahmen wurden Concanavalin A- (ConA) beschichtete Deckgläser hergestellt. Dafür wurden die Deckgläser mit 3 % ConA bedeckt, welches nach einigen Minuten zum Großteil wieder entfernt wurde. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 15 min wurden die Gläser mit sterilem dH₂O gewaschen und über Nacht getrocknet. Zum Mikroskopieren wurden 4 – 6 µl Hauptkultur-Zellen auf die Deckgläser gegeben und auf die Objektträger gelegt. Es wurden Bilder mit einem 63x-oder 100x-Öl-Objektiv des Mikroskops „Axiovert 200 M“ mit Hilfe der Kamera „ORCA-ERA-1394“ (Tabelle 7) gemacht, wofür Immersionsöl (ImmersionTM 518F, ZEISS) verwendet wurde. Es wurden der Durchlicht- und GFP-Kanal (Extinktion: 488 nm, Emission: 509 nm) verwendet und meist Bildstapel mit Schritten von 0,5 µm angefertigt. Es wurde die Software Volocity[®] (Tabelle 8) verwendet. Die Belichtungszeiten und die Signalverstärkung („gain“) waren der jeweiligen Signalstärke angepasst. Für die Mikroskopie unter Stress-Bedingungen und über einen gewissen Zeitraum wurden gekammerte Deckgläser (8 Kammern, THERMO FISHER SCIENTIFIC) verwendet, die mit Poly-L-Lysin (0,1 %) beschichtet wurden. Dafür wurde das Poly-L-Lysin auf die Deckgläser gegeben, der Großteil wurde abgenommen und die Gläser mit dH₂O gewaschen. Die Zellen aus einer LFM-Hauptkultur wurden auf die beschichteten Deckgläser gegeben, 5 min stehen gelassen und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit dH₂O gewaschen und mit 300 µl LFM überschichtet. Den Zellen wurden je Stress 100 µg/ml Kongorot oder 0,5 µg/ml Caspofungin zugegeben. Die Zellen wurden in den angegebenen Zeitabständen fotografiert.

5.6.2 Immunfluoreszenz-Analyse von *S. cerevisiae*-Zellen

Es wurde eine Vor- bzw. Hauptkultur der Zellen in LFM angezogen. In der exponentiellen Phase wurde die Menge Zellen entnommen, die einer OD₆₀₀=2 entsprach. Diese wurden pelletiert (3 min, 3000 rpm) und mit PBS + 2% BSA gewaschen. Anschließend wurde 1 ml PBS + 2 % BSA zugegeben und die Proben 30 min bei RT rollend inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (3 min, 3000 rpm) und anschließend 1 h bei RT rollend in PBS + 2 % BSA + Primärantikörper (hier: Kaninchen-anti-Flo11, 1:2500, Tabelle 9) inkubiert. Die Proben wurden dann dreimal in PBS + 2 % BSA gewaschen und anschließend für 30 min in PBS + 2 % BSA + Sekundärantikörper (hier: Ziege-anti-Kaninchen DylightTM, 1:1000, Tabelle 9) bei RT inkubiert. Erneut folgten drei Waschschrte mit PBS + 2 % BSA und die Zellen wurden dann in 500 µl PBS + 2 % BSA aufgenommen und mikroskopiert.

5.6.3 Tropftest mit *S. cerevisiae*

Für einen seriellen Tropftest mit *S. cerevisiae*-Zellen wurden diese zunächst in einer Vorkultur über Nacht in YPD angezogen. Es wurde anschließend durch Verdünnen der Vorkultur in frischem YPD eine Hauptkultur angelegt und nach 4 – 6 h die OD₆₀₀ bestimmt. Eine Zellmenge, die einer OD₆₀₀ von 0,1 entsprach, wurde entnommen und in 1 ml sterilem dH₂O + Amp verdünnt. Folgend wurde eine Verdünnungsreihe mit fünf Schritten mit einer jeweiligen Verdünnung von 1/5 in dH₂O + Amp angelegt. Von diesen fünf Verdünnungen wurden je 2 µl auf die gewünschten Platten getropft. Diese wurden dann 2 – 5 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend fotografiert.

5.6.4 Waschtest zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums auf Agar

Zur Bestimmung des haploid adhäsiven Wachstums der Hefezellen wurde ein Agar-Waschtest durchgeführt. Die Stämme wurden dafür in einer Vor- und Hauptkultur in YPD angezogen und anschließend die Menge Zellen entnommen, die 1 OD₆₀₀ entsprach. Diese wurden dann in 1 ml sterilem dH₂O verdünnt und 10 µl der Verdünnung wurde auf eine YPD-Platte aufgetropft. Die Platten wurden 4 – 5 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend fotografiert. Unter fließendem Wasser wurden die nicht adhären Zellen abgewaschen und die Platten erneut fotografiert. Die noch zu erkennenden Biofilme stellen die adhären Zellen dar.

5.6.5 Test auf Pseudohyphenbildung: nach (Gimeno *et al.*, 1992)

Für die Pseudohyphenbildung wurden diploide Stämme (frisch gekreuzt, 5.4.3) auf SLAD-Medium + Trp (10 ml einer sterilen 40 mM Tryptophan-Lösung auf 1 l) vereinzelt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Kolonien mit Hilfe eines Stereo- und Tetradenmikroskops fotografiert.

5.6.6 Biofilmbildung auf halbfestem Agar

Die zu testenden Stämme wurden in einer YPD-Vor- bzw. Hauptkultur angezogen. In der logarithmischen Phase wurden 1 OD₆₀₀ Zellen der Kultur entnommen und in 1 ml sterilem dH₂O + Amp verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 5 µl auf YP-Platten mit Glukose (2 % oder 0,5 %) und 0,3 % Agar-Agar getropft. Sollten die Biofilme auf Nitrocellulose Membran wachsen, so wurde diese in einem Wasserbad autoklaviert und 3 Tage zwischen sterilen „Blotting“-Papieren gepresst getrocknet. Anschließend wurden auf diese Membranen ebenfalls 5 µl der Kulturen aufgetropft und die Membranen dann auf die halbfesten Agar-Platten gelegt. Die Platten wurden 2 – 14 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend fotografiert. Alternativ wurden Zellen von Platte mit Hilfe eines spitzen Zahnstochers auf die halbfesten YP-Platten mittig aufgebracht.

5.6.7 Phosphorylierungs-Assay mit verschiedenen Stressen

Es wurden für die zu untersuchenden Stämme eine Vorkultur in YPD oder SC-Trp angelegt. Aus dieser wurden dann für jede Mutante je zwei Hauptkulturen inokuliert. Diese wurden 4 – 5 h schüttelnd bei RT inkubiert und anschließend wurde in eine der beiden Kulturen die entsprechende Stresssubstanz

zugegeben (100 µg/ml Kongorot, 0,5 µg Caspofungin oder 1,5 mg/ml Koffein). Nach einer weiteren Inkubation von 2 h, oder für die kinetische Untersuchung nach 0, 15, 30, 45 und 60 min, wurden aus einer Zellmenge, die 1 OD₆₀₀ entspricht, Proteine extrahiert und eine Western Blot Analyse durchgeführt (5.5). Die Blots wurden mit den Antikörpern Kaninchen-anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), Maus-anti-Mpk1 (D-1) und Kaninchen-anti-Tubulin (Tabelle 9) behandelt und die erhaltenen Signale mit ImageJ quantifiziert (Tabelle 8) (Schneider *et al.*, 2012).

5.6.8 Resazurin-Assay mit verschiedenen Stressen

Mit dem Farbstoff Resazurin kann bestimmt werden, wie hoch der Anteil an lebenden Zellen in Kulturen ist, da dieser von den Zellen zu dem fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert wird (O'Brien *et al.*, 2000; Fai & Grant, 2009; Nakayama *et al.*, 1997). Für den Assay wurden die Hefezellen über Nacht in SC-Medium angezogen. Am Morgen wurden 0,2 OD₆₀₀ aus den Kulturen entnommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß in 1 ml frisches SC-Medium mit oder ohne jeweiligen Stress (100 µg/ml Kongorot, 0,5 µg Caspofungin, 1,5 mg/ml Koffein oder 5 % EtOH) gegeben und 4 - 5 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm) und die Pellets in je 115 µl SC-Medium + 85 µl 0,02 % Resazurinlösung gelöst. Diese Ansätze wurden dann in eine schwarze 96-Well-Platte mit flachem Boden (SARSTEDT) gegeben und im Fluorimeter bei 37 °C vermessen. Dabei wurde für 2,5 h alle 15 min die Fluoreszenz gemessen, um den höchst möglichen Wert an gemessener Fluoreszenz abzuspannen (Extinktion: 535 nm, Emission: 590 nm). Dies ist nötig, da Resorufin von den Zellen bei zu langer Inkubation zum nicht fluoreszierenden Hydroresorufin umgewandelt werden und dies zu falschen Ergebnissen führen kann (O'Brien *et al.*, 2000). Für die Berechnungen wurden immer die Zeitpunkte der Messung verwendet, an denen die Fluoreszenz der jeweiligen Probe am höchsten war. Dabei gilt, je höher die Fluoreszenz, desto mehr lebende Zellen befinden sich in der Probe.

5.6.9 Bestimmung des Glucangehalts

Zur Bestimmung des Glucangehalts wurden die Zellen mit Anilinblau angefärbt: nach (Okada *et al.*, 2010). Die Zellen wurden über Nacht in SC-Medium angezogen, am nächsten Tag wurde durch Verdünnen eine Hauptkultur angelegt. In der exponentiellen Phase wurde die Menge Zellen, die 1 OD₆₀₀ entsprach, entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl 0,05 % Anilinblau-Lösung (in PBS verdünnt) gelöst. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert. Die Färbung wurde am Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal überprüft. Die Proben wurden im Fluorimeter analysiert (schwarze Mikrotiterplatte (SARSTEDT), Extinktion: 410 nm, Emission: 455 nm).

5.6.10 Bestimmung des Chitingehaltes

Der Chitingehalt wurde durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau analysiert: nach (Liesche *et al.*, 2015). Für die Zellen wurde je eine Vor- und Hauptkultur in SC-Medium angelegt. In der exponentiellen

Phase wurde die Menge an Zellen, die 1 OD₆₀₀ entsprach, entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Zum Pellet wurde anschließend 200 µl Trypanblau-Lösung (10 µg/ml, in PBS) gegeben. Die Analyse wurde im Fluorimeter durchgeführt (schwarze Mikrotiterplatte (SARSTEDT), Extinktion: 620 nm, Emission: 700 nm).

6 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Uscanga, B. & Francois, J. M. (2003).** A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology* **37**, 268–274.
- Auesukaree, C., Damnernsawad, A., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Boonchird, C., Kaneko, Y. & Harashima, S. (2009).** Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied genetics* **50**, 301–310.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M. & Andrews, B. (2001).** Transcriptional Coregulation by the Cell Integrity Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2 and the Cell Cycle Regulator Swi4. *Molecular and cellular biology* **21**, 6515–6528.
- Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., Mckenzie III, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. & Pringle, J. R. (1998).** Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943–951.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. & Cardenas, M. E. (2007).** Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 57–69.
- Beauvais, A., Loussert, C., Prevost, M. C., Verstrepen, K. & Latgé, J. P. (2009).** Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS yeast research* **9**, 411–419.
- Belle, A., Tanay, A., Bitincka, L., Shamir, R. & O'Shea, E. K. (2006).** Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 13004–13009.
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C., Heinisch, J. J. & Arroyo, J. (2010).** Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Omics : a journal of integrative biology* **14**, 679–688.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., La Rodríguez de Concepción, M. L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. & Arroyo, J. (2008).** The Sequential Activation of the Yeast HOG and SLT2 Pathways Is Required for Cell Survival to Cell Wall Stress. *MBoC* **19**, 1113–1124.
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q. & Geiger, B. (2003).** Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual review of cell and developmental biology* **19**, 677–695.

- Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W. & Zurbriggen, M. D. (2015).** AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PloS one* **10**, e0137652.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513–1523.
- Booth, I. R., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U. & Miller, S. (2007).** Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nature reviews. Microbiology* **5**, 431–440.
- Botstein, D. & Fink, G. R. (1988).** Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science (New York, N.Y.)* **240**, 1439–1443.
- Botstein, D. & Fink, G. R. (2011).** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704.
- Breeden, L. L. (2003).** Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Current biology : CB* **13**, R31-8.
- Brückner, S. & Mösch, H.-U. (2012).** Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **36**, 25–58.
- Cavalieri, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R. & Polsinelli, M. (2003).** Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of molecular evolution* **57 Suppl 1**, S226-32.
- Chachisvilis, M., Zhang, Y.-L. & Frangos, J. A. (2006).** G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15463–15468.
- Chen, Y., Feldman, D. E., Deng, C., Brown, J. A., Giacomo, A. F. de, Gaw, A. F., Shi, G., Le, Q. T., Brown, J. M. & Koong, A. C. (2005).** Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cancer research : MCR* **3**, 669–677.
- Christiano, R., Nagaraj, N., Fröhlich, F. & Walther, T. C. (2014).** Global proteome turnover analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Cell reports* **9**, 1959–1965.
- Cullen, P. J. & Sprague, G. F. (2012).** The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* **190**, 23–49.
- Deresinski, S. C. & Stevens, D. A. (2003).** Caspofungin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **36**, 1445–1457.
- Dichtl, K., Samantaray, S. & Wagener, J. (2016).** Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cellular microbiology* **18**, 1228–1238.

- Dowell, R. D., Ryan, O., an Jansen, Cheung, D., Agarwala, S., Danford, T., Bernstein, D. A., Rolfe, P. A. & Heisler, L. E. & other authors (2010).** Genotype to phenotype: a complex problem. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 469.
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J. J. & Dufrêne, Y. F. (2009).** The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature chemical biology* **5**, 857–862.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J. & Salazar, G. A. & other authors (2019).** The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research* **47**, D427-D432.
- Esposito, R. E. & Klapholtz, S. (1981).** Meiosis and Ascospore Development. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*.
- Evans, N. A., Hoyne, P. A. & Stone, B. A.** Characteristics and Specificity of the Interaction of a Fluorochrome from Aniline Blue (Sirofluor) with Polysaccharides.
- Fai, P. B. & Grant, A. (2009).** A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. *Chemosphere* **74**, 1165–1170.
- Ferrell, J. E. (1996).** Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends in biochemical sciences* **21**, 460–466.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G. F. & Käppeli, O. (1981).** Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in microbial physiology* **22**, 123–183.
- Gentzsch, M. & Tanner, W. (1996).** The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *The EMBO journal* **15**, 5752–5759.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077–1090.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D. & Jacq, C. & other authors (1996).** Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)* **274**, 546, 563-7.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. & Davenport, K. (1998).** MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **62**, 1264–1300.
- Hartwell, L. H. (1974).** *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological Reviews* **38**, 164–198.
- Heinisch, J. J., Dupres, V., Alsteens, D. & Dufrêne, Y. F. (2010).** Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nature protocols* **5**, 670–677.

- Heinisch, J. J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A. & Dufrêne, Y. F. (2010).** Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS one* **5**, e11104.
- Hilton, J. L. (1960).** Effect of Histidine on the Inhibitory Action of 3-Amino-1,2,4-Triazole. *Weeds* **8**, 392.
- Holstein, T. W. (2012).** The evolution of the Wnt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a007922.
- Honigberg, S. M. (2011).** Cell signals, cell contacts, and the organization of yeast communities. *Eukaryotic cell* **10**, 466–473.
- Huang, C. Y. & Ferrell, J. E. (1996).** Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10078–10083.
- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M. & Strahl, S. (2008).** Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Molecular microbiology* **68**, 1438–1449.
- Jacoby, J. J., Nilius, S. M. & Heinisch, J. J. (1998).** A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Molecular and General Genetics MGG* **258**, 148–155.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G. & Schwob, E. & other authors (2004).** A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast (Chichester, England)* **21**, 947–962.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (2005).** Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**, 43–51.
- Jentoft, N. (1990).** Why are proteins O-glycosylated? *Trends in biochemical sciences* **15**, 291–294.
- Jin, C., Parshin, A. v., Daly, I., Strich, R. & Cooper, K. F. (2013).** The Cell Wall Sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 Are Required for Stress-Induced Nuclear to Cytoplasmic Translocation of Cyclin C and Programmed Cell Death in Yeast. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**.
- Jung, U. S. & Levin, D. E. (1999).** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**, 1049–1057.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J. & Levin, D. E. (1995).** The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes & Development* **9**, 1559–1571.

- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y. & Levin, D. E. (1996).** Activation of Yeast Protein Kinase C by Rho1 GTPase. *The Journal of biological chemistry* **271**, 9193–9196.
- Karunanithi, S., Vadaie, N., Chavel, C. A., Birkaya, B., Joshi, J., Grell, L. & Cullen, P. J. (2010).** Shedding of the mucin-like flocculin Flo11p reveals a new aspect of fungal adhesion regulation. *Current biology : CB* **20**, 1389–1395.
- Katsumi, A., Orr, A. W., Tzima, E. & Schwartz, M. A. (2004).** Integrins in mechanotransduction. *The Journal of biological chemistry* **279**, 12001–12004.
- Ketela, T., Green, R. & Bussey, H. (1999).** *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p Is a Potential Cell Wall Stress Sensor and Upstream Activator of the PKC1-MPK1 Cell Integrity Pathway. *Journal of Bacteriology* **181**, 3330–3340.
- Kim, K.-Y. & Levin, D. E. (2010).** Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast (Chichester, England)* **27**, 541–548.
- Kim, K.-Y., Truman, A. W. & Levin, D. E. (2008).** Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Molecular and cellular biology* **28**, 2579–2589.
- Klis, F. M., Boorsma, A. & Groot, P. W. J. de (2006).** Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **23**, 185–202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. (2002).** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* **26**, 239–256.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. & Schiebel, E. (1999).** Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963–972.
- Kock, C., Arlt, H., Ungermann, C. & Heinisch, J. J. (2016).** Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cellular microbiology* **18**, 1251–1267.
- Kock, C., Dufrêne, Y. F. & Heinisch, J. J. (2015).** Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and environmental microbiology* **81**, 806–811.
- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P. W. & Cabib, E. (1995).** Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1–3)-glucan. *The Journal of biological chemistry* **270**, 1170–1178.

- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Cabib, E. (1997).** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1--6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1--3)-glucan, and chitin. *The Journal of biological chemistry* **272**, 17762–17775.
- Konigsberg, W. (1972).** [13] Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. In *Enzyme structure*, pp. 185–188. Edited by C. H. W. Hirs. New York, NY: Acad. Press.
- Kopecka, M. & Gabriel, M. (1992).** The influence of Congo red on the cell wall and (1-3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **158**, 115–126.
- Kraushaar, T., Brückner, S., Veelders, M., Rhinow, D., Schreiner, F., Birke, R., Pagenstecher, A., Mösch, H.-U. & Essen, L.-O. (2015).** Interactions by the Fungal Flo11 Adhesin Depend on a Fibronectin Type III-like Adhesin Domain Girdled by Aromatic Bands. *Structure (London, England : 1993)* **23**, 1005–1017.
- Kumamoto, C. A. (2008).** Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 667–673.
- Kumamoto, C. A. & Vines, M. D. (2005).** Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annual review of microbiology* **59**, 113–133.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. & Francois, J. (2006a).** Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147–1166.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. & Francois, J. (2006b).** Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147–1166.
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D. & François, J. (2003).** Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20345–20357.
- Letunic, I. & Bork, P. (2018).** 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research* **46**, D493-D496.
- Levin, D. E. (2005).** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **69**, 262–291.
- Levin, D. E. (2011).** Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175.

- Liesche, J., Marek, M. & Günther-Pomorski, T. (2015).** Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Liu, H., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1993).** Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science (New York, N.Y.)* **262**, 1741–1744.
- Liu, H., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1996).** *Saccharomyces cerevisiae* S288c Has a Mutation in Flo8, a Gene Required for Filamentous Growth. *Genetics* **144**, 967–978.
- Lo, W.-S. & Dranginis, A. M. (1998).** The Cell Surface Flocculin Flo11 Is Required for Pseudohyphae Formation and Invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *MBoC* **9**, 161–171.
- Lodder, A. L., Lee, T. K. & Ballester, R. (1999a).** Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 1487–1499.
- Lodder, A. L., Lee, T. K. & Ballester, R. (1999b).** Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 1487–1499.
- Loibl, M. & Strahl, S. (2013).** Protein O-mannosylation: what we have learned from baker's yeast. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 2438–2446.
- Lommel, M., Bagnat, M. & Strahl, S. (2004).** Aberrant Processing of the WSC Family and Mid2p Cell Surface Sensors Results in Cell Death of *Saccharomyces cerevisiae* O-Mannosylation Mutants. *Molecular and cellular biology* **24**, 46–57.
- Longtine, M. S., Mckenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. & Pringle, J. R. (1998).** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961.
- Lööke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A. (2011).** Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* **50**, 325–328.
- Louis, E. J. (2016).** Historical Evolution of Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor protocols* **2016**.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H. & Helleday, T. (2005).** Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* **33**, 3799–3811.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di-Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J. & Ram, A. & other authors (1997).** Large Scale Identification of Genes Involved in Cell Surface Biosynthesis and Architecture in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435–450.

- Lutz, A. P., Schladebeck, S., Renicke, C., Spadaccini, R., Mösch, H.-U. & Taxis, C. (2018).** Proteasome Activity Is Influenced by the HECT_2 Protein Ipa1 in Budding Yeast. *Genetics* **209**, 157–171.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B. & Snyder, M. (1997).** SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)* **275**, 1781–1784.
- Makino, A., Prossnitz, E. R., Bünemann, M., Wang, J. M., Yao, W. & Schmid-Schönbein, G. W. (2006).** G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *American journal of physiology. Cell physiology* **290**, C1633-9.
- Mamoun, C. B., Beckerich, J.-M., Gaillardin, C. & Kepes, F. (1999).** Disruption of YHC 8, a Member of the TSR 1 Gene Family, Reveals Its Direct Involvement in Yeast Protein Translocation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11296–11302.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* **53**, 159–162.
- Manners, D. J., Masson, A. J. & Patterson, J. C. (1973).** The structure of a β -(1→3)-d-glucan from yeast cell walls. *Biochemical Journal* **135**, 19–30.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. (2000).** Regulatory Mechanisms for Modulation of Signaling through the Cell Integrity Slt2-mediated Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1511–1519.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. & Molina, M. (2000).** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1511–1519.
- Marza, E., Camougrand, N. & Manon, S. (2002).** Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. *FEBS letters* **521**, 47–52.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D. & Richards, M. P. & other authors (2004).** Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17593–17598.
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P. & Parandoosh, Z. (1997).** Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of immunological methods* **204**, 205–208.
- Nobel, H. de, Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. & Klis, F. M. (2000).** Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 9)**, 2121–2132.

- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A. & Takai, Y. (1995).** A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **14**, 5931–5938.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000).** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5421–5426.
- Okada, H., Abe, M., Asakawa-Minemura, M., Hirata, A., Qadota, H., Morishita, K., Ohnuki, S., Nogami, S. & Ohya, Y. (2010).** Multiple functional domains of the yeast 1,3-beta-glucan synthase subunit Fks1p revealed by quantitative phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants. *Genetics* **184**, 1013–1024.
- Orlean, P. (2012).** Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* **192**, 775–818.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. (1996).** Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **15**, 2196–2207.
- Peake, I. (1989).** The polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* **42**, 673–676.
- Pereira, G., Tanaka, T. U., Nasmyth, K. & Schiebel, E. (2001).** Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *The EMBO journal* **20**, 6359–6370.
- Philip, B. & Levin, D. E. (2001).** Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and cellular biology* **21**, 271–280.
- Piao, H. L., Machado, I. M. P. & Payne, G. S. (2007).** NPFxD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *MBoC* **18**, 57–65.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. & Vai, M. (1997).** Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 463–469.
- Qian, F., Wei, W., Germino, G. & Oberhauser, A. (2005).** The nanomechanics of polycystin-1 extracellular region. *The Journal of biological chemistry* **280**, 40723–40730.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B. & Levin, D. E. (1999).** Mid2 Is a Putative Sensor for Cell Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 3969–3976.

- Ram, A. F. J. & Klis, F. M. (2006).** Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature protocols* **1**, 2253–2256.
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M. & Kuchler, K. (2003).** The Yeast Protein Kinase C Cell Integrity Pathway Mediates Tolerance to the Antifungal Drug Caspofungin through Activation of Slt2p Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling[†]. *Eukaryotic cell* **2**, 1200–1210.
- Reynolds, T. B. & Fink, G. R.** Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation.
- Reynolds, T. B. & Fink, G. R. (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)* **291**, 878–881.
- Reynolds, T. B., an Jansen, Peng, X. & Fink, G. R. (2008).** Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryotic cell* **7**, 122–130.
- Roberts, R. L. & Fink, G. R. (1994).** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development* **8**, 2974–2985.
- Rodicio, R., Buchwald, U., Schmitz, H.-P. & Heinisch, J. J. (2008).** Dissecting sensor functions in cell wall integrity signaling in *Kluyveromyces lactis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45**, 422–435.
- Rodicio, R. & Heinisch, J. J. (2010).** Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast (Chichester, England)* **27**, 531–540.
- Roncero, C. & Durán, A. (1985).** Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology* **163**, 1180–1185.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463–5467.
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M. & Arroyo, J. (2017).** The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* **4**.
- Sarode, N., Davis, S. E., Tams, R. N. & Reynolds, T. B. (2014).** The Wsc1p cell wall signaling protein controls biofilm (Mat) formation independently of Flo11p in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda, Md.)* **4**, 199–207.
- Schmitt, M. (2017).** Zelluläre Expression und Lokalisation des Wsc Domänen Proteins Wsc4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit.
- Schmitz, G. F. (2016).** Expression und Lokalisation der Sensorproteine des Zellintegritäts-Signalweges aus *Saccharomyces cerevisiae* unter verschiedenen Stressbedingungen. Masterarbeit.

- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012).** NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature methods* **9**, 671–675.
- Schöppner, P. (2017).** Strukturelle und funktionelle Analyse von Wsc-Domänen aus *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit.
- Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986).** *Methods in yeast genetics*: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shively, C. A., Eckwahl, M. J., Dobry, C. J., Mellacheruvu, D., Nesvizhskii, A. & Kumar, A. (2013).** Genetic networks inducing invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* identified through systematic genome-wide overexpression. *Genetics* **193**, 1297–1310.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989).** A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- Straede, A., Corran, A., Bundy, J. & Heinisch, J. J. (2007).** The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast (Chichester, England)* **24**, 321–334.
- Straede, A. & Heinisch, J. J. (2007a).** Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS letters* **581**, 4495–4500.
- Straede, A. & Heinisch, J. J. (2007b).** Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS letters* **581**, 4495–4500.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354.
- Tucker, S. L. & Talbot, N. J. (2001).** Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* **39**, 385–417.
- Valdivieso, M.-H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. & Popolo, L. (2000).** Chitin Synthesis in a *gas1* Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **182**, 4752–4757.
- Vannini, G. L., Poli, F., Donini, A. & Pancaldi, S. (1983).** Effects of Congo red on wall synthesis and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Science Letters* **31**, 9–17.
- Vay, H. A., Philip, B. & Levin, D. E. (2004).** Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 3281–3288.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. & Ballester, R. (1997).** A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 13804–13809.

- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. & Ballester, R. (1997).** A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 13804–13809.
- Verstrepen, K. J. & Klis, F. M. (2006).** Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**, 5–15.
- Watanabe, Y., Irie, K. & Matsumoto, K. (1995).** Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology* **15**, 5740–5749.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K. & Matsumoto, K. (1997).** Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology* **17**, 2615–2623.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. (2009).** Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1189–1191.
- Watts, H. J., Véry, A. A., Perera, T. H., Davies, J. M. & Gow, N. A. (1998).** Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, England)* **144** (Pt 3), 689–695.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J. C. (1994).** Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**, 119–123.
- Weis, W. I. & Kobilka, B. K. (2018).** The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual review of biochemistry* **87**, 897–919.
- Wilk, S., Wittland, J., Thywissen, A., Schmitz, H.-P. & Heinisch, J. J. (2010).** A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness in vivo. *Molecular genetics and genomics : MGG* **284**, 217–229.
- Wood, P. J. & Fulcher, R. G.** Specific Interaction of Aniline Blue with (1 →, 3)-B-D- Glucan*.
- Zarzov, P., Mazzoni, C. & Mann, C. (1996).** The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *The EMBO journal* **15**, 83–91.
- Zebisch, M., Jackson, V. A., Zhao, Y. & Jones, E. Y. (2016).** Structure of the Dual-Mode Wnt Regulator Kremen1 and Insight into Ternary Complex Formation with LRP6 and Dickkopf. *Structure (London, England : 1993)* **24**, 1599–1605.

Zhou, X., Stumpf, M., Hoch, H. & Kung, C. (1991). A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science (New York, N.Y.)* **253**, 1415–1417.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Wachstumsformen von <i>S. cerevisiae</i> .	2
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i> .	5
Abbildung 3: Aufbau der <i>S. cerevisiae</i> -Zellwand.	6
Abbildung 4: Aktuelles Modell des Zellwandintegritäts-Signalwegs.	8
Abbildung 5: Schema der Wsc-/Mid-Sensorfamilie.	11
Abbildung 6: Strukturen der WSC-Domäne aus Wsc1 (<i>S. cerevisiae</i>) und Kremen1 (<i>H. sapiens</i>).	14
Abbildung 7: Stammherstellung und Wachstumstest der Wsc- und Mid-Mutanten.	18
Abbildung 8: Lokalisationsüberprüfung der mNeongreen-Fusionsproteine.	21
Abbildung 9: Menge der mNeongreen-Fusionsproteine.	22
Abbildung 10: Analyse der Proteinstabilität.	24
Abbildung 11: Menge an Slt2 und Slt2-P in YPD.	26
Abbildung 12: Untersuchung der β -1,3-Glucan- und Chitinmenge.	27
Abbildung 13: Wachstumstest unter verschiedenen Stressbedingungen.	29
Abbildung 14: Resazurin-Assay unter verschiedenen Stressbedingungen.	32
Abbildung 15: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Koffein- Caspofungin- und Kongorotstress.	34
Abbildung 16: Slt2-Phosphorylierung unter Kongorotstress zu verschiedenen Zeitpunkten.	36
Abbildung 17: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Koffein- und Caspofunginstress.	37
Abbildung 18: Analyse des β -1,3-Glucan- und Chitin-Gehalts unter Caspofungin Stress.	38
Abbildung 19: Untersuchung der Flo11 Expression und Agaradhäsion. A:	40
Abbildung 20: Test auf Pseudohyphenbildung.	41
Abbildung 21: Biofilmbildung auf halbfestem Agar.	42
Abbildung 22: Biofilmbildung über 14 Tage auf halbfestem Medium.	43
Abbildung 23: Biofilmbildung auf YP-Medium mit 2 % und 0,5 % Glukose.	44
Abbildung 24: Untersuchung auf abgelöste Proteine bei der Biofilmbildung.	45
Abbildung 25: Wachstumstest von S288C- und Σ 1278b-Stämmen und -Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen.	47
Abbildung 26: Slt2-Phosphorylierungsassay unter Kongorot- und Caspofunginstress.	49
Abbildung 27 Lokalisation von Rlm1-NG im Σ 1278b und S288C Hintergrund.	51
Abbildung 28: Lokalisation von Swi4-NG im Σ 1278b und S288C Hintergrund.	52
Abbildung 29: Lokalisation von Swi6-NG im Σ 1278b und S288C Hintergrund.	53
Abbildung 30: Untersuchung der β -1,3-Glucan- und Chitinmenge im Σ 1278b- und S288C-Stammhintergrund.	55

Abbildung 31: Sequenz und Struktur der Wsc-Domäne (CRD) von Wsc1..	58
Abbildung 32: Phänotypische Untersuchung der CRD-Mutanten.....	59
Abbildung 33: Slt2-Phosphorylierungsassay der CRD-Mutanten unter Kongorotstress.	61
Abbildung 34: Analyse der β -1,3-Glucanmenge der Wsc1-Varianten unter Caspofungineinfluss.	62
Abbildung 35: Zusammenfassung der Wachstumsphänotypen.....	71
Abbildung 36 Modell der funktionellen Rolle der aromatischen Aminosäuren in der CRD.	81

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Systematische funktionelle Analyse der Wsc- und Mid-Sensorfamilie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“ selbständig von mir und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Zudem habe ich mich keinen anderen als von mir in der Arbeit ausdrücklich erwähnten und gekennzeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient und wurde in dieser oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

(Ort, Datum)

(Anne Pia Lutz)

Danksagung

Die Danksagung und der Lebenslauf enthalten persönliche Daten und sind deshalb nicht Teil der Online-Veröffentlichung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Anne Pia Lutz
Geburtsdatum:	27. Juli 1989
Geburtsort:	Pforzheim
